

MAY 2 1951

LIBRARY
FISH & WILDLIFE SERVICE
PACIFIC OCEANIC FISHERY
INVESTIGATIONS

No. 1 (Contribution. A. No. 1)

December, 1950.

BULLETIN 2060
OF
TOKAI REGIONAL
FISHERIES RESEARCH LABORATORY
FISHERIES AGENCY

水 産 廳
東海区水産研究所研究報告
第 1 号

東 海 区 水 産 研 究 所

東京都中央区月島三号地

昭和 25 年 12 月

TOKAI REGIONAL FISHERIES RESEARCH LABORATORY

TSUKISHIMA, TOKYO, JAPAN.

December, 1950.



水産食品鮮度判定の化學的研究

天 野 慶 之

内 容 目 次

緒 言	1
既往の研究	3
W. Walkiewicz の研究	8
實驗の部	10
I. Walkiewicz 法の追試	10
II. 魚肉水浸出液中 HgCl_2 と反應し得べき物質	12
1. 沈澱中にアムモニア参加の有無	13
2. 沈澱中に Hexon base 参加の有無	14
A. 魚肉水浸出液に三塩化醋酸を加えて除蛋白した濾液中の HgCl_2 沈澱物	15
B. 魚肉水浸出液中の HgCl_2 沈澱を除いた濾液中の燐タングステン酸沈澱物	15
III. 魚肉水溶性蛋白質の溶出條件	18
1. 浸出時間と溶出量との關係	19
2. 浸出用蒸溜水の用量と溶出量との關係	19
3. 同一試料肉を用水を換えて反覆浸出した場合	20
IV. 魚肉の腐敗過程に於ける水溶性窒素の増減に及ぼす因子	20
1. 酵素の影響を検定する一つの試み	23
2. 浸出用液の水素イオン濃度と溶出量との關係	23
3. 浸出用液に塩類共存の場合の溶出量の変化	25
A. 同一魚肉に就ての NaCl , CaCl_2 及び $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)$ 溶液中に溶出する窒素量	26
4. 魚肉の腐敗に伴い溶出する水溶性磷酸の変化	26
A. 各種魚肉の腐敗経過と水溶性磷酸の増量	27
B. 水溶性磷酸の増加と揮発性塩基窒素増加量との關係	28
5. 魚肉水浸出液に含まれる全灰分と溶出窒素量との關係	29
V. HgCl_2 と結合沈澱する魚肉水溶性蛋白質	30
1. 魚肉の食塩水可溶蛋白質と HgCl_2 の沈澱形成	30
2. 牛肉の食塩水可溶蛋白質と HgCl_2 との沈澱形成	31

3. 魚肉の稀薄アルカリ可溶性蛋白質と HgCl_2 との沈澱形成	32
4. 魚肉水浸出液の pH と HgCl_2 沈澱の形成	32
A. 浸出後に魚肉浸出濾液の pH を調節した場合	32
B. 浸出時に pH を調節した場合	33
5. 純水可溶性蛋白質の腐敗と HgCl_2 沈澱の形成	34
6. ゼラチン溶液の腐敗と HgCl_2 沈澱の形成	35
VI. 魚肉水溶性蛋白質の荷電と HgCl_2 沈澱の形成	36
1. 新鮮魚肉水浸出液を用いての pH 調節による HgCl_2 沈澱の消失	39
2. 腐敗魚肉水浸出液を用いての pH 調節による HgCl_2 沈澱の形成	40
3. 2 價水銀塩の蛋白沈澱能の比較	41
VII. 鮮度低下魚肉水溶性蛋白質と HgCl_2 との結合様式	42
VIII. 魚肉水溶性蛋白質の安定性と HgCl_2 沈澱の形成	43
1. 魚肉の鮮度低下とアルコールによる水溶性蛋白質の凝固	44
A. 各種濃度のアルコールに魚肉水浸出液を滴下した場合	44
B. 魚肉水浸出液に無水アルコールを滴下した場合の濁濁並に沈澱の出現	46
2. 魚肉水浸出液中に HgCl_2 が共存する場合のアルコールによる水溶性蛋白質の凝固	47
A. アルコールによる凝固蛋白質の水への再溶性	48
B. 魚肉水浸出液中に HgCl_2 が共存する場合のアルコールによる凝固蛋白質窒素量の定量	49
C. 魚肉水浸出液中に HgCl_2 が共存する場合のアルコールによる凝固蛋白質窒素量の変化と腐敗経過	50
D. 水溶性蛋白質の電荷の影響を検定する一つの試み	51
3. 魚肉水溶性蛋白質の安定性に及ぼすその他の要因	55
A. 魚肉の NaCl 抽出液中の蛋白質の安定性	55
B. 魚肉の稀薄アルカリ抽出液中の蛋白質の安定性	55
C. 魚肉の尿素抽出液中の蛋白質の安定性	56
IX. 魚肉水溶性蛋白質中の活性基と HgCl_2 との結合可能性	57
1. 魚肉水浸出液のフォルマリン処理と HgCl_2 沈澱の消失	58
2. 魚肉水浸出液のモノ沃変醋酸処理と HgCl_2 沈澱の消失	60
A. モノ沃度醋酸のみの場合	60
B. アムモニアを用いて中和したモノ沃度醋酸処理	61

3. 魚肉水浸出液の尿素による処理と HgCl_2 沈澱形成の有無	62
A. 魚肉水浸出液に尿素を溶解せしめた場合の HgCl_2 沈澱形成の有無	62
B. 魚肉の尿素液による抽出液と HgCl_2 沈澱形成の有無	63
4. 魚肉の稀薄アルカリ抽出と SH 基の生成並に HgCl_2 沈澱の形成	64
5. 魚肉の鮮度低下と SH 基の出現並に HgCl_2 沈澱との関係	65
6. 魚肉の鮮度低下とその水溶性蛋白質の等電点の変化	66
X. 魚肉水浸出液中の HgCl_2 沈澱性窒素と HgCl_2 との定量的結合	73
1. 魚肉水浸出液に加える HgCl_2 量と沈澱窒素量との関係	73
2. 光電比濁計による魚肉水浸出液と HgCl_2 との沈澱量測定	74
A. ビンナガマドロを放置腐敗せしめた例	75
B. ナガスクデラ肉を放置腐敗せしめた例	76
C. カツオを放置腐敗せしめた例	79
3. 魚肉水浸出液中の HgCl_2 沈澱窒素量と HgCl_2 濁濁度との関係	81
4. 白降汞 $\text{Hg}(\text{NH}_2)\text{Cl}$ の比濁測定	83
5. 新鮮魚肉の稀薄アルカリ抽出液と HgCl_2 との沈澱物の光電比濁測定	83
6. 魚肉浸出液量を一定にした場合の沈澱濁濁度と HgCl_2 濃度との関係	85
7. 魚肉水浸出液の Forma in 処理による HgCl_2 沈澱減少の比濁測定	85
XI. HgCl_2 沈澱現象による蛋白質分子の腐敗による分解の観察	86
1. 腐敗過程と N/Hg の変化	87
A. ビンナガマドロの実験例	87
B. ナガスクデラ肉の実験例	88
2. 稀薄アルカリ抽出蛋白質と N/Hg の変化	89
3. 稀薄食塩水抽出蛋白質と N/Hg の変化	90
XII. 本沈澱反應適用不能の魚種に就て	91
1. サメ肉の腐敗と HgCl_2 沈澱	91
A. ヨシキリサメ蛋白質の不溶性	92
B. ヨシキリサメ浸出液の HgCl_2 沈澱中の N/Hg の値	94
C. ヨシキリサメ肉水浸出液のアルコールによる凝固	95
2. イカ肉の腐敗と HgCl_2 沈澱	96
A. イカ肉の変敗経過と HgCl_2 沈澱の変化	96
B. HgCl_2 沈澱中の N/Hg の値	98

C. イカ肉水浸出液のアルコールによる凝固	99
XIII. 魚体の部位による腐敗の差異	100
1. サバ全魚体による予備実験	100
2. 南氷洋産冷凍鯨肉の船上に於ける変敗	101
3. 冷凍鯨肉の内地に於ける輸送並に冷蔵中の変敗	103
XIV. HgCl_2 以外の金屬塩の使用	105
XV. 本沈澱反應の加熱肉に對する應用	106
1. 魚肉水浸出液中の蛋白質の加熱による凝固現象に就て	106
A. 鮮度低下のビンナガマグロ浸出液の蛋白凝固像	106
B. 新鮮ビンナガマグロ浸出液中の蛋白凝固の程度	109
C. 各加熱温度に於ける鮮度低下のビンナガマグロ浸出液中の凝固蛋白窒素量	109
2. HgCl_2 沈澱による加熱肉の変敗判定	110
A. 同じ魚肉を使つて鮮肉と加熱肉の HgCl_2 沈澱反應の比較	111
B. 加熱肉滴下液汁並に加熱肉水浸出液に見られる HgCl_2 沈澱の内容	113
XVI. 總括並に討議	116
XVII. 結 論	126
Summary	128
文 獻	132

魚肉の新鮮度を適確に知ることの重要性はいろいろの面から考えられる。その一は製造加工上の理由からであり、第二には検査機関に於ける判定法をより科学化する点に於てであり、更に第三には食品衛生上の見地からである。

水産製造には冷凍、罐詰、乾燥、塩蔵、煉製、燻製等多様な加工様式があるが、原料魚の新鮮度如何に依つて、いずれの方法が最適であるかは、大いに問題があるとおもう。製品の品質の優劣が原料の新しさによつて支配される点に於ては勿論どの加工技術でも共通であるが、それでもなお且つ、新鮮度の順位によつては加工手段の変更も可能な筈であり、又そのような配慮をめぐらす事が今後の水産製造技術者の任務の一であらうと思う。例えば冷凍品としては極めて新鮮な漁獲物以外は原料たり得ないが、煉製品に於ては若干の鮮度低下原料も採用し得る余地がある。それは、その工程中に、水晒し、壓搾等の水溶性物質の除去操作があり必ずしも最良の鮮度を必須条件とはしないからである。従つて魚市場等に於て鮮魚の配給計画を樹てる場合、その末端にまで鮮度維持が困難であるような魚介類に就ては、家庭配給を中止して、寧ろ処理能率の優れた加工場に廻し、その利用率を低下させないような処置をとることが屢々有効な訳であつて、このような際、最も要望せられるのは簡易且つ適確な鮮度判定法なのである。又、同一魚種に就て連続的な加工法を実施する場合、例えばビンナガマグロの罐詰業などではその製品の品質規格の統一上、逐日原料魚の鮮度を管理する必要がある。殊に生鮮時に於て何等異常の見出せなかつた原料でも蒸煮後に異常臭、異味等を生ずる例*はこの種の罐詰作業に於て多く経験せられるところであり原料魚の鮮度判定が重要視せられる理由である。又、最近輸出冷凍魚及び罐詰等が漸次戦前の状況に復歸しつつあるが、それらの輸出検査事業も漸く在來の官能的判定法のみを以てしては処理し得ない段階にまで達しているように思う。何故ならば、それだけでは頻発する苦情申入れ（クレーム）**、返送品等に対して充分論據ある反証をあげ得ないからである。しかも検査方式は在來の如く強制的ではなく任意に臨時検査的に執行するのであるから尙一層、検査法の適確さを要するのである。このような場合に業者も納得し又仕向地に対しても合理的な説明の可能である科学的な鮮度判定法が緊要である大きな理由があるように考える。

第三の公衆衛生的見地から鮮魚介の新鮮度が問題となるのは國民の食生活上、蛋白質資源

* 冬季ビンナガマグロの青肉の問題がその好例である。

** 1949年3月、ビンナガマグロ油漬罐詰約 5000函が品質不良の故を以て米国から返送された。

が水産物に重点的に依存している現状からして当然なことである。近時食品衛生法実施に伴い食品の衛生監視の事業が各府縣衛生部、保健所等を通じて漸く普及しつつあるが、なおおだ浅く、鮮魚介の品質判定、食用の可否等に就ては全く官能的検査の域を脱していない現状である。勿論熟練した判定の行われる場合に於ける官能的判定の実用性に就て輕卒に之を否定し去ることは慎まねばならぬが食品衛生監視の如く一定の裁決を要する場合等では單なる五感的検査だけで処理出来ぬことは必然であつて科学的方法による客観的な妥当性が要望せられる所以である。

このように魚肉の新鮮度判定の重要性は頗る近時高まりつつあるが、未だ充分採用し得る程度の科学的方法の実施せられた例をきかない。その最も根本的な理由は判定方法が研究せられなかつたと云う事ではなくして、寧ろ実施上簡易であつて且つ科学的根據のある方法が少いと云う事に外ならないのである。従つてそのような面で種々の方法を検討し差當つて一般的に採用し得る簡易法を導くことが最も緊要であると考えらる。

本研究は以上の如き理由から、簡易に実施し得て且つ充分理論的根據ある魚肉新鮮度判定法を設定しようとする著者の意図によつて取上げられたものであるが、検討の結果一部の欠陥を除いては実施上の見込もつき得たので茲に蛋白質沈澱反応による魚肉鮮度判定法として提案することとした次第である。

本文に入るに先だち、本研究に就て絶えざる御激励を與えられた前水産試験場長、東京水産大学教授田内森三郎博士、東海区水産研究所長宇田道隆博士、実験を進めるに當つて懇篤なる御教示を賜つた東海区水産研究所石田正男博士、山田紀作技官、東秀雄博士、京都大学清水貞博士、北海道大学小幡彌太郎博士の諸先生に謹んで感謝の意を捧げる。特に石田先生からは終始有益なる御指導を辱うし著者の最も深く感激することである。重ねて厚く感謝の意を表する。また研究の間、実験の一部を担当せられ多大の御協力を與えられた竹井誠氏、内山均氏、富谷章子氏、山田金次郎氏、内野幸雄氏、松永重夫氏に深く謝意を表する。

なお本研究に対して研究費並に研究試料の御援助を賜つた藤野産業株式会社北川彦造氏、冷凍魚介類價格査定委員会大河原幸作、飯島康司の両氏、中水運輸株式会社梶山愛之助氏、財団法人水産研究会に衷心より御禮申上げる。

既 往 の 研 究

獸肉並に魚介肉類に関する新鮮度測定法の研究は極めて多いのであるが、これを測定方法から分類すると物理学的方法、化学的方法、細菌学的方法、組織学的方法に分れると思う。

物理的判定法としては、魚体若くは魚肉の弾性、硬度等を数量的に測定する方法、魚体の電気抵抗測定、魚肉浸出液の粘度或は表面張力の測定などが挙げられる。

魚市場等で魚体を指頭で押してそれに受ける弾力感で鮮度をしらべるやり方は古くから行われている。これに着目した田内、広瀬、和田 (1931)²⁾は、この弾性即ち魚肉の一部に一定の変形を興うるに要する力、この力を除いたのち原状に復歸する程度、並に原状に復歸する速さを測定した結果、復原する程度及びその速度は略々一定であることを見出し、変形を興うるに要する力を弾性測定装置を用いて数量的に表し得るとした。この数値は一般に死後強直期に大きく以後経過時間に伴つて減少することが知られ迅速に読みの得られる点、原魚を傷けることなく測定し得る点等、他の方法及び得ぬ長所を有するが魚形の相違、一定魚種についてはその測定位置による差違に就て検討の余地を残している。

魚体の死後、その電気抵抗は一定時間後に急激に低下する。その機構に就ては明かでない点が多いが、含水量の変化、筋肉蛋白質の変性、電解質としての無機塩類の増量等の影響が考えられる。電気抵抗が低下し始めるまでに要する時間は魚体の放置温度が高い程早いことが知られているから筋肉の自家消化乃至は腐敗が何等かの影響を有することは確かであろう。田村 (1932)²⁾、山田、北野 (1948)³⁾らの電気抵抗と鮮度との関係に関する報告では、一定限度にまで低下した抵抗は以後殆ど変化していない。しかもその値が必ずしも各魚種を通じて近似ではない。魚体そのものに就ての実験 (田村)、魚肉の磷酸塩抽出液についての実験 (山田、北野) 結果でもこの点が注意される。伊藤、京塚、杉崎 (1949)⁵⁾によれば、魚体の電気抵抗は電極間の距離とは比例せず金属の如き第1種導体でない事が確実で、マグロの切身に就て測定した結果では、時間経過に従つて先ず抵抗が増え、腐敗現象が起ると減少へと傾く事が観察せられた。更に詳細な研究を経た上で取上ぐ可き方法のように思う。

筋肉水浸出液の粘度は新鮮時に高く不鮮となるに伴い低下すると云う事実は Vassiliow (1930)⁶⁾が獸肉に就て認めたところである。彼の方法は肉を水と共に加熱しその濾液について行つて、そのような成績を得ているのであるが無加熱の場合は寧ろ不鮮時に粘度

上昇を生ずるのが普通である。著者も本研究に於て絶えず魚肉水浸出液の濾過を行つて來たが鮮度低下に伴い濾過が極めて困難になることを経験している。筋肉蛋白質の粘性を大にする要因は鮮度低下以外に中性塩共存の場合に抽出されるミオシンの如き棒状分子による影響もあり他に構造粘性を考慮せねばならず極めて複雑であるから、詳細な検討を要するものと考え、Vassilowは熱時脱脂綿濾過を行ひその濾液をOstwald 粘度計で測定しているが、その値には極小値があり腐敗時には再び上昇すると述べている。

Smorodintzew 及 Krylova (1939)⁷⁾ 肉浸出液の表面張力減少と肉鮮度との関係を追求めた。蛋白質分解物、電解質の遊離が初期腐敗の際12~30%程度表面張力減少に影響すると云われるが測定方法は簡易であるとは云えない。又含有脂肪の界面に於ける影響も考慮に入れねばならないから研究の余地は残されていると思う。

化學的方法は鮮度測定法のうち最も提案が多く又その対象として取上げられる腐敗分解生産物の種類も多様である。そのうち最も古くから検討せられ広く信頼性を認められているものはアムモニアによる判定法である。

Eber (1891)⁸⁾ に依る濃塩酸によるアムモニアガスの検出法は多くの成書に記載せられ鮮度検定法の代表的方法と考えられ、Tillmans及Otto (1924)⁹⁾ の肉類初期腐敗時に於けるアムモニア含有量30mg/100gの定量的数値が興えられて広く普及するに至つた。魚肉に就ては清水 (1925)¹⁰⁾、木村、熊倉 (1934)¹¹⁾、谷川 (1935)¹²⁾ らの再検討が行われ、いずれも30mg 前後を初期腐敗とすることが適當であるとしている。検査対象の嚴密な測定数値を必要とする場合、また測定に時間的余裕のある場合に於ては最も信頼度の高い方法と云えるが、蒸溜操作を含むために簡易に現場等で実施するには適當でない憾みがある。

アミノ酸の増加も腐敗の進行に伴うものであり鮮度判定の目標たり得ることは事實であるが Van Slyke 法は操作煩雜であり、Sørensen 法は稍簡易ではあるが、測定値が必ずしも正確とは云い難く、更に普遍化を拒むものとして魚種により生鮮時の含有量に不同のあることであつて、アムモニア含有量の如く比較的明確な限界値を決定し得ない欠点があると思われる。

魚肉中の含窒素に対する可溶性窒素の比を以てする方法も記載があるが (1935)¹³⁾、窒素定量にはすべて Kjeldahl 法を用いるのであるから操作上長時間を要する点に於て問題にならない。

トリメチルアミンに依る方法はBeatty 及 Gibbons (1937)¹⁴⁾ に依つて提案された、アムモニアの生産は嚴密には細菌に依る含窒素物の分解のみでなく自家消化過程に於ても起り得るから新鮮時に於ても稍著量のアムモニアを含有する場合もないとは云えない〔大谷(1

921),¹⁵⁾ 山田 (1948)¹⁶⁾。トリメチルアミンは自家消化では全く生成せず、細菌の生産するトリメチルアミノキシダーゼによつてのみ、そのオキシイドからつくられる点、¹⁸⁾と鮮肉中には殆どトリメチルアミンを含まない点がこの方法の提案される主要な理由である。然し乍ら測定法は最も簡易な手段を選んでもフォルマリンによるアムモニア固定後に蒸溜する方法であり、黄色酸化水銀、パームチツト¹⁸⁾等の吸着剤を使用する方法等では煩雑さは免れず普及性の少い欠点がある。

魚肉の分解に応じて NH_2 基、 COCH 基が生成せられ、それらに依る緩衝能も増加するからこれを電気滴定で決めるStansby 及 Lemon (1933)¹⁹⁾の方法もある。これに就てはアミン、アムモニア等が引蛋白態窒素からつくられるために却つて、緩衝能が減少すると云う反対意見も出されている。^{14・20)}

最近小幡、座間^{21・22・23)} (1950) は魚肉の変敗に応じて出現するビペリヂン、ピロリヂン等をパラキノンをを用いてデビペリデルキノンまたはデピロリデルキノンとし、この間、黄色から赤紫色に変わる呈色反応を利用して簡易に鮮度判定を行う方法を提案した。迅速な定性試験法として実用性がある。

硫化水素に依る方法はBudajan (1932)²⁴⁾の記載する鉛糖紙使用の定性的方法、Almy (1925)²⁵⁾及びAlmy法を簡易化した谷川 (1935)²⁶⁾の研究等が挙げられる。 CO_2 気流中で塩酸々性下で溜出させる操作は必ずしも簡易ではなく、溜出量が微量(100g 肉中 0.2~1.0 mg)である点も測定に精緻な技術を要することになる。

インドール法も蒸溜、エーテル抽出、酸及アルカリによるエーテル劃分洗滌、比色等頗る煩雑な操作を要する上、硫化水素以上に微量(100g中1~2ガンマ)であり、実用的な見込は少いが罐詰の肉質を原料時にまで溯つて判定するような際には有効であると云う意見²⁷⁾もある。アムモニア、硫化水素等はいずれも罐詰殺菌に必要な程度の加熱で増加するが、インドールは加熱だけで増量することはあり得ないからである。

蛋白質の変性の程度から魚肉の新鮮度を問題とするようになったのは比較的最近であるが、その創始はBradley及Bailey (1940)²⁸⁾であろう。彼等は蛋白質の初期崩壊で容易に離脱するチロシンを、ウォルフラム酸曹達、燐モリブデン酸に依る比色定量で測定を行っている。操作中、三塩化醋酸による除蛋白後、濾過まで3時間を保持することを規定しているので迅速測定には不適当であるが検討の余地はあるものと考えらる。

蛋白質変性に伴うSH基の出現に就てはMirsky及Anson (1935)^{29・30)}らが注意してより蛋白化学での中心的問題となりつゝあるが、最近、森、泰 (1948, 49)^{31・32)}はSH基の出現と魚肉鮮度との関係を追跡して興味ある成果を得ている。氏等は予め黄血塩濃度0.1ミリモル乃至

0.5 ミリモルの標準液を硫酸鉄硫酸溶液で呈色せしめ、その発色程度と魚肉の赤血塩還元による発色とを比較する簡易法を提案した。但し、森、奈も述べているように、この方法ではSH基以外の還元性物質も反応に関与するから、その検討も必要であろう。SH基をモノ沃変醋酸或はモノ沃変醋酸アミド³³⁾を用いて測定する方法、その他ボーフィリンゲン³⁴⁾等を使用する方法も多いが魚肉鮮度判定への利用例は未だ少いように思う。今後の研究課題であろう。

乳酸定量による方法は古く Fürth (1912)³⁵⁾の研究があるが適確ではない。その理由は筋肉内乳酸生成量はその動物が死直前に置かれた状態如何によつて甚しく異なるためである。最近、山田及協力者 (1948, 49)^{36, 37)}は魚肉の解糖作用を詳しく調べているが、乳酸量は魚体の死後数時間の間にも著しく変動があり、一定値を與え得ぬことを示している。又、最近鯨肉について死後経過時間判定に乳酸量によることが適當であると秋谷、本橋 (1949)³⁸⁾が述べているが上述の論点から吟味を要すると思われる。著者ら (1949)³⁹⁾も鯨肉の死後経過時間の判定を冷凍鯨肉の検査の立場のために検討したが、乳酸の如き中間生成体を問題とするより、むしろその母体であるグリコーゲンを測定する方が鯨肉の場合適當ではないかと考えた。しかし、仮に新鮮度を代表するものとしても測定法が煩雜であつて実用的ではあり得ない。

腐敗に伴つて水溶性磷酸が増量することは当然期待せられるが、魚肉水浸出液を除蛋白後、直接モリブデン青を形成せしめて行つた比色法が迅速であることから、著者及竹井 (1946, 47)⁴⁰⁾も検討を加えた。その結果、新鮮魚肉中全磷酸中約60%が水溶性磷酸として所在し、以後腐敗と共に80%前後にまで増加する事実を認めたが、その増加割合が緩徐であることと比色法に熟練を要するために利用性少く、研究を中断している。

色素還元による方法は腐敗に於ける酸化還元の変化を追求する案であるが、古くからメチレン青還元法⁴¹⁾が牛乳の品質判定に使われている。肉類に就てこの方法を利用したのは Tillmans, Strohecker 及 Schutz (1921)⁴²⁾であるが脱色に要する時間が鮮肉で90~240分、不鮮肉で57~150分で、比較的長時間であるに拘らず、正確な数値が得られていない。メチレン青以外⁴³⁾にヤヌスグリーン、レバズリン等があり殊にレバズリンは変色が3段階に分れる点、便宜であると云われる。未だ行われていないようであるが時間を短縮するために一定濃度の水素供與体を加えることも考えられるのではないかと思う。

同様な趣旨であるが、肉と水とをウエッキングー瓶中に密閉して、溶存酸素量の時間による減少量をしらべる Tillmans 及 Mildner (1916)⁴⁴⁾の方法、硝酸塩還元による方法⁴⁵⁾ (Fürth, 1912)³⁵⁾等もあるが、いずれも成果のあげ難い方法である。

最近, Faber (1949)⁴⁶⁾ は魚肉の壓出液を用いて室温で蒸溜し, 溜氣中の揮発還元性物質によるアルカリ性過マンガン酸カリの還元量を以てする方法が適確であると報じている。

水素イオン濃度による方法は肉類では Herzner 及 Mann (1929)⁴⁷⁾, Andrijewski (1927),⁴⁸⁾ van Oyen (1933),⁴⁹⁾ Postma (1934)⁵⁰⁾ の研究, 魚肉では大島 (1926)⁵¹⁾ の報告があげられ, 多くの追試もあるようであるが, 死直後に一旦酸性領域 (pH 5.5~5.8) に達し, 腐敗初期で 6.1~6.3 に上昇, 腐敗が進めば pH 7.0 を越えることが認められている点で一致している。死直後の極めて新鮮な時に pH 6.3 前後であることが, pH 測定による鮮度判定の弱点の如く云う議論もあるが, 官能的観察も作るものであるから, 鮮肉と不鮮肉との同・pH を誤認することはあり得ないと考えるので, アムモニア法に次ぐ重要性があるものと思う。殊に近年は簡易な試験紙も多く普及しているから魚肉の鮮度判定のために習熟しておく必要があると考える。

揮発酸はアミノ酸, 乳酸その他を母体として腐敗の際生ずるものであるが, Hillig 及 Clark (1938)⁵²⁾ は鮭, 鮎罐詰に就き, Hillig (1939)⁵³⁾ は鯀卵罐詰について其の品質判定に有効であるとしたのを始め, Clague (1942)⁵⁴⁾ の罐詰原料魚としての鯀の新鮮度判定に応用した実験例がある。又, Sigurdsson (1947)⁵⁵⁾ は, 鯀その他を用い稍詳細に揮発酸測定法を検討して, トリメチルアミン測定と共に, その定量結果が, 鮮度低下のよい標識となる事を報告している。著者は現在, 鯀肉塩蔵品について, 揮発酸による変敗検出を行いつつあるが, 変質の度合に応じて, 構成揮発酸が質的に変化してゆく事実を一部明かにし得た。

肉色素の退色による方法は最近著者 (1949)⁵⁶⁾ が鯀肉の死後経過時間判定に利用性があると認めたものであるが, 鯀肉の一定比水浸出液をロビボンド色調計で測定する方法である。赤色色素板の数値で 10.0 以上の差が認められるので, 鯀肉では有用であるが, 他の魚種に就ては検討していない。鰓の血色素を同様に扱えるのではないかと考えている。

昇汞による沈澱反応は Walkiewicz (1936)⁵⁷⁾ が鯀肉の初期腐敗検出に創案したものである。同氏によれば, 屠殺後 pH 6.0 以下に肉の酸度が降下しない肉では新鮮肉と雖も反応陽性となり, その後追試した Busch (1936)⁵⁸⁾, Keller 及 Möller (1939)⁵⁹⁾ も同様の所見で或程度まで鮮度判定に有効であるとしている。この方法は肉の水浸出液を昇汞液に滴下して生ずる沈澱の有無で判定するのであるから, 極めて簡易であり, その論據が興えられれば興味ある方法である。著者が本研究に着手した動機は Walkiewicz 法の魚肉に対する応用の可否の検討と, その沈澱形成の機作を魚肉鮮度変化との関係に於て明かにする点にあった。

細菌學的方法には、牛乳に於けるBreed値の如き直接計檢法と平板培養法とがあげられる。魚肉に就ての研究は極めて少く、最近坂口、田村 (1948)⁶⁰⁾ は魚肉の10倍水浸出の上澄液 0.01cc を塗抹染色して計測する方法を行い揮発性塩基窒素との関係を調べている。1g中細菌数 $10^5 \sim 10^8$ を以て腐敗の初期とする考え方は二三の研究者 [Hunter(1920),⁶¹⁾ Nickerson 及 Proctor (1935),²⁰⁾ 猿谷 (1932),⁶²⁾ 木俣 (1935)⁶³⁾] によつて認められているが、直接法、培養法ともに精度が悪い点、殊に培養法は長時間を要するために全く実用性に乏しい。

組織學的方法是今井 (1935),⁶⁴⁾ 木村 (1925)⁶⁵⁾ 等の記載があり、最近では市川、斎藤 (1949)²⁾ らの研究が行われ、腐敗経過の肉組織変化の状況が明かになりつゝあり極めて興味があるが、鮮度判定法としての見地からは長時間の固定、包埋、切断、染色等の操作を含むため直接の応用は困難と考えられる。

以上の諸文献を通覧して、夫々特色のあることは認められるが、短時間に少くとも30分以内に結果を示し得ること且つ充分科学的根據を有すること、操作が簡易であること等を條件として、これらの諸方法を吟味すると以下のように要約出来る。

I) 測定法は比較的簡易であるが、標識として鮮度を代表するかどうか疑問であるものとして魚肉浸出液粘度、表面張力、電気抵抗測定等があげられ、

II) 測定法そのものがあまり適確でないものとして色素還元、硝酸塩還元等があり、

III) 鮮度を代表するが測定方法が煩雜なものとして、アムモニア、アミノ酸、全窒素に対する可溶性窒素の比、トリメチルアミン、インドール、硫化水素、揮発酸、細菌培養法、組織檢査法等が考えられ、

IV) 測定法が簡易で或る程度鮮度を代表するものとして水素イオン濃度、魚肉の弾性、SH基測定、パラキノン呈色反応、昇汞沈澱反応等が考えられる。

この中で、著者が特に昇汞による沈澱反応を検討した理由は操作が簡易であることと、その反応の主体が後述するように、この金属塩と魚肉水溶性蛋白質との間の特異な沈澱現象にあることが推測されたからであり、実験によつて原著者が全く觸れていなかった反応機構が漸次明らかにし得たものと思う。

W. Walkiewicz の研究

昇汞液を使用して獸肉の腐敗檢出を始めて行つたのはW. Walkiewicz (1936)⁵⁷⁾ であり牛、馬、豚肉に就て屠殺直後の鮮肉から漸次腐敗に至らしめ、肉眼的にも明らかに腐敗の域に達したと認められるまでの間、経過日数毎に沈澱出現の有無を記録した。その觀察結

果によると pH 6.2 前後を境界として沈澱が出現するようになること並に屠殺直後の極く新鮮な肉でも沈澱の出現することを認めた。従つて死後一定時間を経たのちに pH が 6.0 以下になるような正規の状態変化をする肉には適用出来る旨を述べ、屠殺前に疲労の甚しい獣体の肉とか長距離を貨車輸送した直後の屠殺等では正規の pH 降下が見られず、死後 24 時間以内を pH 6.2 以上に保持し、これらではいずれも本反応陽性に出ることを注意した。次で同年 G. Busch (1936)⁵⁸⁾ は Walkiewicz 法を追試した報告を出し、同じく pH 6.2 を境界として反応出現を認め放置温度 7°C では 4 日後に、0°C では 8 日後に本反応陽性となることを示した。

その後 3 年を経て H. Keller 及 H. Möller (1939)⁵⁹⁾ が、本法の追試を行い、各種肉類に就て検討した。同氏らは昇汞沈澱反応と併行して pH 測定法、Eber 法によるアムモニウム検出を行つてゐるが、その結果によると結締組織、血液では pH 値が高く、これが酸性化も余り著しくなく従つて本反応が陽性に出る機会が多く試料調製の際、結締組織、血液等の混入を避ける可きであるとした。又、試料として牛肉、犢肉、豚肉、馬肉及び病獣肉、切迫屠殺肉等が選ばれているが、Eber 法で反応陽性となる 1~2 日以前にこの沈澱反応が出現するので初期腐敗の検出には牛肉では有効であるが、豚肉、馬肉等では健獣、病獣を問わず、本反応陽性となるので利用性がないと述べ、牛の場合でも病獣肉では反応が不規則であると報じている。

昇汞沈澱反応に就ては上記 3 篇の報文以外にはその後報告されていないのであるが、以上の内容からも、一つの興味ある現象を見出しているにも拘らず、その反応の機構に觸れた検討を行つていないために、この方法による鮮度測定の可能性が未解決の儘になつてゐるものと考えられる。

その一は、昇汞が古くから蛋白沈澱劑、有機塩基沈澱劑として知られているにも拘らず新鮮肉の水溶液と何故沈澱を生じないかと云うことである。水溶性蛋白が充分溶出している筈の肉浸出液で昇汞が沈澱を生じない事実が新鮮肉蛋白質の特質であるとすれば極めて興味ある現象と云わねばならない。

その二には、鮮度低下した肉浸出液が沈澱を生ずる理由である。その沈澱の内容が蛋白であるか、他の低分子の塩基性物質であるかも明かでない上に、腐敗の経過とその沈澱形成との関係の数量的取扱も行われていないのであるから、これらの点の吟味も必要である。著者はこのような反応機構の基礎的事実が明らかにされることによつて、鮮度測定法としての応用の範囲も決定し得るものと考え、魚肉に対する本法の適用を目的とし、その検討を企て、些か新知見を加え得たものと信ずる次第である。

實 験 の 部

I. Walkiewicz 法 の 追 試

Walkiewicz 記載の通りの昇汞沈澱反応が生成するか如何を確認するために市販牛肉を試料として約10°Cの冷蔵庫に放置して、連日、本反応出現の有無を検した。

実験法は脂肪部を除いた牛肉200gを大型ペトリ皿に入れ上記の温度に放置、毎日この中より5.0gを秤取50ccの蒸留水で浸出、10分後に濾過し、濾液0.1ccを1% HgCl_2 及0.05%醋酸加1.0% HgCl_2 各3.0ccに滴下して濁濁乃至は沈澱の出現を観察した。その結果、同氏記載通りの反応を確認することが出来た。即ち原著者は灰紫色の沈澱形成を述べているが、本実験では8日後から顯著にその現象が観察された。但しこの程度の腐敗は官能的に充分判定出来る域に達したものである。結果を第1表に示す。この結果から Walkiewicz の云うpH6.2を境界として反応が出現する事実も認められるように思う。但し、測定は東洋濾紙製 pH 試験紙メチル・レッド、クロール・フェノール・レッドに依る。

第1表 牛肉の腐敗経過と昇汞沈澱反応

放 置 日 数	0	1	2	3	4	6	7	8	9
1% HgCl_2	—	—	—	+	+	+	+	+	+
0.05% 醋酸 加 1% HgCl_2	—	—	—	—	+	+	+	+	+
pH	5.4	5.6	5.6	5.8	6.2	6.6	6.6	6.8	7.2

備考：+は反応出現を示す

上記の簡単な試験で新鮮肉の水浸出液が HgCl_2 と沈澱しない事は明らかであるので、次にイロシ、サバ、カツヲ、クヂラの肉を用いて牛肉と同じような現象が起り得るか否かを確かめることにした。

実験法は牛肉の場合に準じ、約10°Cの冷蔵庫に試料を放置し、連日5g:50ccの水浸出液を作製し、pH測定と併せて本反応を試みた。これらの試料は東京魚市場より購入したものであるが、クヂラ肉は日本水産相模丸より入手し、又クヂラ肉の放置温度は室温で4~11°Cの範囲である。腐敗の進行状況を知るために揮発性塩基窒素の定量をも併行したが、測定法はWeber及Wilson⁶⁷⁾の減壓蒸留法である。

第2表 イワシ肉の腐敗経過と昇汞沈澱反応

放置日数	0	1	2	3	4
A 液	—	+	+	+	+
B 液	—	—	—	+	+
p H	5.8~6.0	6.0	6.0	6.0	6.2
揮発性塩基窒素 mg/100g	11	25	29	32	—

1947. 10. 9~10. 13

備考： A液は1% HgCl_2 液，B液は0.05%醋酸加1% HgCl_2 液を示す。

第3表 サバ肉の腐敗経過と昇汞沈澱反応

放置日数	0	1	2	3	4	5
A 液	—	—	—	—	+	+
B 液	—	—	—	—	—	+
p H	5.8	5.8	5.8	5.8	6.0	6.0~6.2
揮発性塩基窒素 mg/100g	16	—	25	20	33	35

1947. 10. 8~10. 13

第4表 カツヲ肉の腐敗経過と昇汞沈澱反応

放置日数	0*	1	2	3	4	5	7	9	10	11	14
A 液	—	—	—	—	—	±	—	+	+	+	+
B 液	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
p H	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	6.4	6.4	6.4	7.0
揮発性塩基窒素 mg/100g	23	22	18	25	23	23	29	193	614	795	1025

1947. 7. 14~7. 28

備考： 7 日目から冷蔵庫故障のため約30°Cの室温に上昇，急激に腐敗した。

第5表 クヂラ肉の腐敗経過と昇汞沈澱反応

放置日数	0	1	2	3	4	5	6	7
A 液	—	—	—	—	—	+	+	+
B 液	—	—	—	—	—	±	+	+
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	6.2	6.8	6.4
揮発性塩基窒素 mg/100g	18	19	13	11	17	41	75	100

1948. 2. 11~2. 17

備考： 室温放置 4~11°C，試料は冷蔵クヂラ赤肉。

実験結果は第2乃至第5表の如くであるが二三の魚肉並に鯨肉に於ても牛肉の場合と同様に新鮮肉の水浸出液が HgCl_2 と沈澱反応を與えない事が確かめられた。又，反応出現時

の pH も多少の相違はあるが 6.2 前後である点一致して居り、その時の揮発性塩基窒素も初期腐敗時の 30mg/100g 附近にあるようである。Walkiewicz は沈澱の色調と、沈澱形成時の HgCl_2 液の螢光発色の有無などを記録しているが、魚肉の場合、その浸出濾液が薄黄色程度で牛肉の如く肉色素が液中に移行して來ることが少いので多くの場合、沈澱物は白色乃至灰白色で螢光も見られない。但し、新鮮魚肉の場合、 HgCl_2 液と浸出液を混じたのち、1 晝夜程で全液が微かに濁濁するような場合、螢光を帯びる例はある。以上、Walkiewicz の昇汞沈澱反応を牛肉、魚肉、鯨肉について試み初期腐敗検出に有効である結果を得たので、次に本反応沈澱物の内容に就て検討を行うこととした。

II. 魚肉水浸出液中 HgCl_2 と反應し得べき物質

魚肉の水浸出液中で HgCl_2 と結合し得る物質にはアミノニアと塩基性アミノ酸群と蛋白質との 3 者が挙げられる。アミノニアは HgCl_2 と結合して mercuric aminochloride $\text{Hg}(\text{NH}_2)\text{Cl}$ 白降汞を形成する。魚肉の腐敗に伴つてアミノニア始め各種の揮発性塩基の生成は当然起るからこの沈澱物中に白降汞が含まれるであろうことは想像に難くない。

アミノ酸を水銀塩⁶⁵⁾として分離する試みは在來多く行われているから HgCl_2 と結合し得るアミノ酸その他も勿論考慮に入れねばならない。即ち HgCl_2 を使用する例としては Lysin をバリタ共存の下で沈澱せしめたり、Cysteine も又沈澱せしめられる。アミノ酸ではないが Cholin, Neurin, Betaine も HgCl_2 で分離出来、又 Piperazine もそうである。

他の水銀塩では HgSO_4 で Tryptophan, Histidine, Cystine も分離され、 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ では Arginine, Ornithine, Glutamic acid あり、 $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ では Proline, Aspartic acid, Glutamic acid が挙げられ、 $\text{Hg}(\text{CN})_2$ では Methylmercaptan が分離せられる。

但し、以上は多く蛋白質の加水分解物から分離方法として用いられるもので蛋白質共存の場合の反応でないことは無論であるが、上記の諸物質の中、一部のものを除いては軽度の腐敗過程に於て魚肉から遊離して來るものがある筈であるから当然考慮に入れる必要がある。

第三の蛋白質であるが、 HgCl_2 が蛋白沈澱劑として用いられている例は多い。例えば毒物學で、昇汞中毒の場合に蛋白を飲用せしめることは古くから行われて居り、生化学の領域で尿中蛋白の檢出法として HgCl_2 , HCl , KBr , アルコールの混液で行う古法⁷⁰⁾などがある。

重金屬塩が蛋白を沈澱せしめる機構として陰性の蛋白イオンに陽性金屬イオンが作用し

て不溶解性の蛋白金属塩の生成が起るであろうと云う推測⁷²⁾は普通行われている処であり、従つて HgCl_2 の如き塩が有用な蛋白沈澱劑であることは他の金属塩と並んで当然の事とせられている爲に、Walkiewiczの見出したような事実は見過されていたのではないかと思われる。即ち、金属塩の蛋白沈澱は反対イオンとの結合として單純に理解せられたため⁷³⁾にそれ以上の立入つた研究が少いのである。Bergmann, Michael⁷⁴⁻⁷⁵⁾らの金属錯イオンの蛋白沈澱も要するにこの結合を錯イオンに展開せしめたに過ぎないように見受けられる。

蛋白沈澱劑の研究に於ても例えばWasteney及Porsook⁷⁶⁾らは、予め調製せられた各種蛋白質Albumin, Metaprotein, Proteose, Peptone等に三塩化醋酸、硫酸アムモン、タンニン酸その他を試用し、窒素定量の結果、各々の蛋白が夫々の沈澱劑で何%まで沈澱せしめられたかを全窒素量を基に比較すると云う実験方式をとり、沈澱機構そのものの研究は行つていない。類似の研究には谷川の報告もあり、最近では神立⁷⁸⁾らも除蛋白劑の研究を進めているが、三塩化醋酸、バルンスタイン試薬、スツツプー試薬その他を各種食品中の蛋白沈澱劑として試みた場合の性能比較の範囲を出でないので蛋白質中の如何なる基が沈澱劑と結合するかの詳細に就ては今後なお明かにする可き部分に属するものと考え

る。以上のように HgCl_2 には少くとも3種の窒素化合物に結合し得る性質がある事は明かであり、現在著者が問題としている魚肉水浸出液中にも、これらの物質が種々の割合で含まれていることは当然考え得られるから、いずれの窒素形態が本沈澱物の主体をなすかを先づ明らかにする必要があると信ずる。

1) 沈澱中にアムモニア参加の有無

初期腐敗魚肉水浸出液と HgCl_2 とが形成する沈澱物が $\text{Hg}(\text{NH}_2)\text{Cl}$ が主であるか否かは本試験法を鮮度判定に用いる場合極めて重要なことである。何故ならば仮に白降汞が沈澱の主体であるとしても、一種のアムモニア検定法と云う事となり、鮮度判定への利用性は充分考え得るからである。

仍て著者は普通の NH_3 が HgCl_2 と $\text{Hg}(\text{NH}_2)\text{Cl}$ を形成して沈澱を生ずるに必要な最低濃度を測定し、これを実際の魚肉水浸出液が昇汞沈澱を生ずる場合の原肉の揮発性塩基窒素量と比較してみることとした。

実験法は滴定によつて正確に濃度を定めたアムモニア液を作製し、 NH_3 態Nとして1%液を原液とし、之を夫々の濃度に稀釋して、1% HgCl_2 液及び0.05%醋酸加1% HgCl_2 液各3.0ccに、各濃度のアムモニア液0.1ccを加えて沈澱の生成を見ると第6,7表の如くなる。

第6表 1% HgCl_2 及醋酸酸性1% HgCl_2 液各3.0ccに0.1ccのアムモニア液を滴下した場合の $\text{Hg}(\text{NH}_2)\text{Cl}$ 形成

1% NH_3 -N含有アムモニア液の稀釋率	1/50	1/80	1/100	1/150	1/200	1/300
稀釋液 0.1cc 中の NH_3 -N mg	0.02	0.013	0.01	0.007	0.005	0.003
1% HgCl_2 液	+	+	+	±	—	—
0.05% 醋酸加1% HgCl_2 液	+	±	—	—	—	—

第7表 1% HgCl_2 液3.0ccに滴下量を変えてアムモニア液を加えた場合の $\text{Hg}(\text{NH}_2)\text{Cl}$ 形成

滴下量 cc 0.1cc中 NH_3 -N mg	0.1	0.2	0.3
0.005	—	+	+
0.010	+	+	
0.025	+		

この結果によると、およそ0.1cc中0.01mgのアムモニア態窒素があれば、それが3.0ccの1% HgCl_2 液で $\text{Hg}(\text{NH}_2)\text{Cl}$ の沈澱をつくることが出来る。0.005mg含有の場合では0.2ccを要するから沈澱形成の最小濃度はやはり0.01mgになる。これを仮に原肉100g中のアムモニア態窒素に換算すると100mgとなる（但し、10gを100cc蒸留水で抽出した液として計算する）。

然るに、第2, 3, 4, 5表から明かなように原肉100gは30~40mgの程度で沈澱反応は陽性に出現している。この値を逆に第6, 7表の0.1cc中の含有量に換算すると0.004~0.003mgとなり、アムモニアだけとすると沈澱形成を行わない濃度である。

従つて、揮発性塩基窒素30~40mgの初期腐敗時の抽出液の示す沈澱は当然アムモニア以外のものが主体であり、それは恐らく蛋白質と考えられる。勿論、100mg以上に揮発性塩基窒素が達する場合（第4, 5表）でも沈澱を生ずるから、このような場合には当然 $\text{Hg}(\text{NH}_2)\text{Cl}$ も含まれる。それは、このような沈澱物に HCl を加えて濾過し（残渣は蛋白質であろう）、濾液にNessler試薬を点すれば、アムモニア所在を示すことから明かである。

2) 沈澱中にHexon base 参加の有無

水銀塩によつて固定せられる窒素形態には塩基性アミノ酸群及びCysteine等が考え得る事は既述の通りである。これらのBaseの分離に用いられる水銀塩は普通硫酸水銀であるが、昇灰の場合も沈澱能力があり得る。仍て次の如き方法に従つて HgCl_2 がどの程度まで

蛋白質以外にアミノ酸群を沈澱せしめる事が出来るかを検討した。

A) 魚肉水浸出液に三塩化醋酸を加え除蛋白した濾液中の昇汞沈澱物

HgCl₂ に Hexon base の沈澱能力がありとすれば、この base を沈澱せしめないような除蛋白剤例えば三塩化醋酸を用いて除蛋白した濾液中に HgCl₂ を加え、その反応の有無によつて沈澱能力を判定し得る筈であろう。

これを確かめる爲に、かなり腐敗に達したカツヲ肉（揮発性塩基窒素 119mg/100g）を使用し このものの 10.0g を細碎し、100cc の蒸留水で浸出 1 時間を行い、その濾液 10.0cc に 20% 三塩化醋酸 1.0cc を加えて約 18 時間放置後、濾置し、濾過を沸騰浴中で 10 分間加温し残余の三塩化醋酸を Chloroform として除き、冷却後この液に 1% HgCl₂ 液 5.0cc を加えた結果沈澱の形成を認め得なかつた。この全溶液は HCl 液性にした場合も沈澱を生じないので、これらの条件下では恐らく HgCl₂ には Hexon base の沈澱能力はないものと考えられる。実験結果は第 8 表の通りである。

第 8 表 腐敗カツヲ肉水浸出液除蛋白後の濾液中の HgCl₂ 沈澱の有無

水溶性全窒素	1586
HgCl ₂ 沈澱窒素	906
三塩化醋酸沈澱窒素	792
三塩化醋酸除蛋白濾液に HgCl ₂ を加え沈澱する窒素	なし
試料カツヲ肉中の揮発性塩基窒素	119

備考： 原肉 100g 中の mg で示す。

この表で興味ある点は HgCl₂ 沈澱窒素量から三塩化醋酸沈澱窒素量を差引いた量が 114 mg で、略々揮発性塩基窒素量に一致している点である。第 6, 7 表の結果から 100mg 以上にアムモニアが達すれば Hg(NH)₂Cl を形成してもよい訳であるから、この差に相当する量は大体に於てアムモニアであるとしてよい。念のために三塩化醋酸沈澱濾液に HgCl₂ を加えて 0.1N NaOH で中和せしめると、白色沈澱が析出する。これを濾別して沈澱を再び HCl に溶解せしめ、Nessler 試薬を加えると濃厚な褐色沈澱を示す。これによつて Hg(NH)₂Cl が酸性領域では沈澱を阻止せられている事がわかる。

B) 魚肉水浸出液中の HgCl₂ 沈澱物を除いた濾液中の隣タングステン酸沈澱物

Hexon base は隣タングステン酸 (P. W. S と略稱する) で沈澱せしめる事が出来るから HgCl₂ 及三塩化醋酸で夫々生じた沈澱を除いた濾液中に P. W. S. で固定せしめられる窒素量がどの程度残存するかを比較することによつて、HgCl₂ が Hexon base をも沈澱させているかどうかを推定出来ると考える。

試料は東京市場より購入のクロカハカジキを用い、脊肉の部分の比較的均一な肉組織を

各々約50gを大型試験管に収め、水分の損失を防ぐために軽く栓を施し、各経過日数に応じて同時に2個の試料を開き、肉を均等に細碎混和してその中より10.0gを称取、蒸留水100ccで冷水浸出を行い、濾液に就てその全窒素、三塩化醋酸沈澱窒素、 HgCl_2 沈澱窒素並にこれ三塩化醋酸及び HgCl_2 の沈澱を除いた各濾液中のP. W. S. 沈澱窒素量を測定した。その方法は、上記各濾液10.0ccを5% H_2SO_4 酸性に於てP. W. S. 5%液2.0ccを加え、沈澱を生ぜしめ、その沈澱物中の窒素をKjeldahl法で測定したのである。

放置條件は第9表記載の室温であるが、腐敗条件を変える意味で、同一試料について脱酸素状態の腐敗区をも設けた。即ち各50gの試料を入れた大型試験管の上部にウーレンフト型小試験管を入れ、この中に2gのピロガロールに濃苛性ソーダ1ccを添加し、密栓を施し、栓と管子との間にパラフィンを用いて、封鎖し、内部を脱酸素状態としたものである。この試料に就ても普通区と同様に上記各形態の窒素量の測定を行つた。なお試料クロカハカジキ100g中の水分68.5%、全窒素3.57%である。

第9、10表の結果から見ると HgCl_2 沈澱窒素を三塩化醋酸沈澱窒素も略々同様な数量的変化を示し、これに平行してP. W. S. 沈澱窒素も各々の濾液中で殆ど相似の増減を見せている。即ち、 HgCl_2 沈澱を除いた濾液中にも、普通脱蛋白（三塩化醋酸）濾液中にも凡そ同量のP. W. S. 沈澱窒素が含まれることは、 HgCl_2 が主として蛋白沈澱剤として反応に参加している事実を示すものと云える。勿論、腐敗経過が進むにつれて三塩化醋酸沈澱窒素量よりも、 HgCl_2 沈澱窒素量が大きい値を示しているから、その差に相当する部分には、既述の如くブムモノフを含むこともあるし、又若干の低分子蛋白質系統の物質も一部加わり得るであろう。

然し、以上の数字から見て、少くとも初期腐敗の段階に於ては HgCl_2 がむしろ蛋白沈澱剤としての作用している事は疑のないところである。嫌氣的腐敗区にあつても、 HgCl_2 の示す態度は略々好氣的腐敗区の場合と同様であるとしてよいと思われる。但し、茲で興味ある事実は、嫌氣的腐敗では必ずしもpH6.0~6.2に達せずとも、 HgCl_2 沈澱の生ずると云うことである。この事はWalkiewiczらの所説の如くpH6.2に肉の鮮度低下がもたらされる事が必要の条件ではなくして、たまたま好氣的腐敗に於て見られる現象であつて、 HgCl_2 と結合可能な基が、腐敗と共に肉蛋白質に於て活性化されれば、その結合能力はpHそのものには関係しないと云う傾向を暗示すると考えられる。

以上を要約すれば、魚肉水浸出液中、 HgCl_2 と反応する物質は、その初期腐敗の過程では主として、水溶性蛋白質であることが推定せられる。

第9表 クロカハカギ肉の腐敗経過と三塩化醋酸並にHgCl₂沈澱濾液中のP.W.S.沈澱窒素量の變化（好氣的腐敗区）

放 置 日 数	0	1	2	4	5	6	7	8	9	11	13	16	19
水 溶 性 全 窒 素	1848	1571	1439	1673	1239	1408	1813	2051	2255	2285	2029	2091	2447
三 塩 化 醋 酸 沈 澱 窒 素	1163	836	538	821	537	625	1159	1016	1173	1054	876	876	1059
同 上 濾 液 中 P.W.S. 沈 澱 窒 素	422	380	434	435	265	350	500	387	370	405	355	195	355
HgCl ₂ 沈 澱 窒 素	なし	なし	700	957	666	751	1301	1141	1220	1223	962	969	1110
同 上 濾 液 中 P.W.S. 沈 澱 窒 素	—	—	422	422	255	372	380	280	280	255	280	270	270
試 料 肉 揮 発 性 塩 基 窒 素	12	24	32	58	130	81	182	226	390	361	349	473	725
水 浸 出 液 pH	5.6	5.6	6.0	6.4	6.6	6.0	6.8	7.0	6.6	7.0	7.8	7.4	7.8
室 温 °C	22~24	22~23.5	22.5	21.5~25	23	26	23	26	25	24.5 ~29.5	23.5	23.0	21.5~22

第10表 クロカハカギ肉の腐敗経過と三塩化醋酸並にHgCl₂沈澱濾液中のP.W.S.沈澱窒素量の變化（嫌氣的腐敗区）

放 置 日 数	0	1	2	4	5	6	7	8	9	11	13	16	19
水 溶 性 全 窒 素	1848	1380	1557	1555	1791	1493	1487	1502	1657	1595	1580	1897	1549
三 塩 化 醋 酸 沈 澱 窒 素	1163	1004	849	846	671	581	625	573	578	750	578	655	558
同 上 濾 液 中 P.W.S. 沈 澱 窒 素	422	403	—	380	385	400	410	360	385	385	380	355	340
HgCl ₂ 沈 澱 窒 素	なし	なし	なし	なし	509	766	711	750	688	790	747	801	700
同 上 濾 液 中 P.W.S. 沈 澱 窒 素	—	—	—	—	340	280	355	338	310	345	260	280	265
試 料 肉 揮 発 性 塩 基 窒 素	12	25	34	32	48	42	51	60	57	61	144	242	135
水 浸 出 液 pH	5.6	5.6	5.8	5.6	5.8	5.8	5.8	5.6	5.8	5.8	6.2	6.6	6.0

III. 魚 肉 水 溶 性 蛋 白 質 の 溶 出 條 件

一般に筋肉蛋白質の抽出調製は、変性を伴わずして実施することが極めて困難であるとされているが、昇温による沈澱反応を行う場合厳密な抽出条件を規定することは、測定上の困難を伴うので常温に於ける抽出に就ての諸条件を吟味し、この反応に参加する蛋白その他の物質が充分溶出するに足る方法を設定することを目標とした。即ち、浸出時間、浸出用水量等と溶出窒素量との関係を明かにし、以後の実験条件に対する規準となした。

平野 (1942) に依れば、ミオシンその他グロブリン系蛋白部分の抽出は甚だ緩慢に行われ、筋肉組織をよく破碎、搗潰した上でも、單に浸出系を攪拌する程度では、充分浸出の促進を図る事が出来ないと注意している。即ち、比較的短時間のうちに浸出が完了するように思われるその終点は実は見掛上のものであるとし、同氏は予め浸出用器具 (乳鉢その他)、石英砂等を冷却しておき、変性の起り難いような低温 (5℃以下) で、よく筋肉を搗潰し、稀酸加里一塩化加里溶液で浸出を行い、更に浸出液渣を搗潰、再び浸出を繰返し、6回の反覆の後、抽出が完了することを報告し、この操作を撽滌的浸出と呼んでいる。

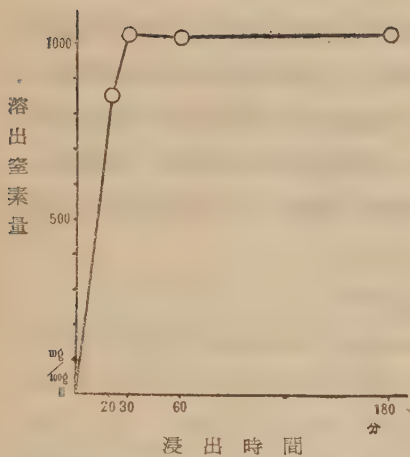
著者の魚肉水浸出液調製は、一般の新鮮度判定の際に於ける操作の簡易化を考慮して、一応上記の見掛けの抽出完了を以て満足することとし、その終末点が、略々どの程度の時間内に納まるかを検討した。

又、浸出の際の温度も、常温下で実験の判定が行われる機会の多かる可きことを想定し、22℃の室温を採用した。

実験材料は鮮度良好な南太平洋産冷凍ナガス鯨赤肉 (1948. 4. 10入手) で全窒素3.50%、水分74.3%のものである。解凍中の drip の損失を避けるため未解凍の儘破碎し、各10.0gを秤取して更に乳鉢中で搗碎し、陶製ビーカー中で蒸溜水による浸出を行つた。浸出温度は22℃で攪拌は磁子製攪拌器を用いて、浸出液がビーカーより溢れぬ程度の廻転数で継続した。濾過には東洋濾紙製5A (9cm) を用い、窒素定量は浸出濾液10.0ccに就てKjeldahl法で行い蛋白窒素は浸出液10.0cc + 20% 三塩化醋酸1.0ccを加えて (終末濃度約2%) 沈澱せしめたものを濾紙上を集めて、5% 三塩化醋酸で洗滌後、硫酸分解、定量を行をう。

第11表 ナガス鯨赤肉水溶性全窒素の溶出量と時間との関係

浸 出 時 間	20	30	60	180
水 溶 性 全 窒 素 mg/100g	846	1014	1015	1014



第1図 ナガスクジラ赤肉水溶性全窒素の溶出量と浸出時間の関係

1) 浸出時間と溶出量との関係

上述の試料10.0gに蒸留水100ccを加え、20分、30分、60分、180分夫々浸出を試み、その水溶性全窒素量を測定した結果は第11表の如くである。この結果からは30分後には殆ど水溶性窒素の溶出は完了するものの如くである第1図はその浸出経過を示す。

2) 浸出用蒸留水の用量と溶出量との関係

一定量の生肉を異なる量の蒸留水を使つて浸出した場合、浸出液中に移行する窒素量に相違が見られるかどうかを調べた。既に上記の実験で30分以上の浸出時間で浸出窒素量が恒量に達するものと考えられるので、10.0gを夫々、20、50、100、200ccの蒸留水で、22°C1時間浸出を行い、その濾液10.0cc中の全窒素量並に蛋白態窒素量を測定した、但し20cc蒸留水で浸出を行つた場合は、濾液が少量であるので特に5.0cc中の上記窒素量を測定した。実験結果は第12表の如くである。

第12表 浸出用蒸留水の用量とナガス鯨赤肉水溶性窒素の溶出量との関係

浸出用蒸留水 cc	浸出濾液10.0cc中の窒素量 mg	10.0g 試料より溶出した全窒素量 mg	10.0g 試料より溶出した蛋白窒素量 mg
20	23.67 *	94.7 *	57.5 *
50	20.28	101.4	57.5
100	10.15	101.5	52.9
200	5.07	101.4	60.5

* この浸出液に限り5.0ccを使用した。

この表で、試料10.0gから溶出した窒素量は浸出液中の夫々の窒素量から計算した値であるが、20ccを除いては極めてよく一致していることがわかる。即ち一定量の鮮肉から溶出する窒素量は使用する浸出用水量に関係がなく恒量であることが認められる。蛋白窒素量は少々相違もあるが大体に於て一定と見てよいであろう。

3) 同一試料肉を用水を換えて反覆浸出した場合

生肉10.0gに蒸留水100ccの割合で1時間の浸出を了つた残滓に就て更に100ccの蒸留水を加え、第2回の浸出を1時間に行い同様第3回の浸出まで試みたが、結果は第13表のようになり第1回浸出で殆ど溶出し盡すことが窺われる。実験法は上記と同じクデラ赤肉を用い、濾過後の浸出残滓を濕潤状態の儘、濾紙と共に第2回の陶製ビーカーに移し、再び蒸留水を加えて1時間攪拌浸出を行つた。攪拌は硝子製攪拌器で繼續した。第2回第3回の浸出液中の窒素量はN/100H₂SO₄で殆ど捕捉し難い程度である。

第13表 浸出残滓中の未溶出窒素の有無

	第1回	第2回	第3回
試料10.0gより溶出した窒素量 mg	1014	0	0

以上の実験結果でHgCl₂による沈澱反応に供する鮮肉の水浸出液の調製に際し反応に関與すべき蛋白質その他は30分の浸出で充分溶出することが明かであり、実験操作に長時間を要することはないと考えられ、又抽出水量も必ずしも Walkiewicz らが採用した10倍量でなくてもよく、使用水量に関係なく目的物の溶出が可能であると思われる。

IV. 魚肉の腐敗過程に於ける水溶性窒素量の増減に及ぼす因子

本試験法の検討を重ねる間、屢々遭遇した事実は魚肉の腐敗経過に伴い水溶性全窒素量が必ずしも一方向に増大しないと云う事である。一般に肉類の腐敗に際しては所謂可溶性窒素が漸増することが認められ、腐敗検出の表徴として全窒素量に対する可溶性窒素量の比を以てする提案のあることは文献の項に記述した通りである。蓋しこの場合の可溶性窒素の意味は次の如き実験法によつて規定せられるものである。即ち試料肉に水を加えて浸出を行いその全量に対して除蛋白剤を加えその濾液中の窒素を以て可溶性(水溶性)窒素とするのである。従つて、一度水に溶出した水溶性蛋白質が除蛋白剤によつて凝固せしめられ残滓中に残るため、濾液には主として低分子の非蛋白態窒素のみが溶存しているのであつて、それが腐敗と共に増大することには何等問題はないのである。

従つて著者が茲にとり上げた水溶性窒素量の変化は主として溶出する蛋白量の異同に基づくものであろう事が先づ想定せられる。即ち、魚肉を水浸出する場合、その時の肉中の蛋白質が不溶性となつてゐるためか、或は又抽出條件が腐敗経過に伴つて生或する諸物質の影響によつて必然的に変更せしめられる爲か、いづれかの因子によつて斯くの如き現象が起るものと考えられる。

この事実は既に清水(1943,'44)⁷⁹⁻⁸²⁾によつて注目され、同教授は魚肉蛋白質が肉中に存在する酵素によつて不溶化せしめられるのではないかと推定している。又、平野(1938)¹²⁸⁾もこの現象を、中性塩抽出を行つた魚肉ミオシンのゲル化に就て取扱い、膠質化学的に液底体に関するOstwald律から説明しようと試みている。変性蛋白が不溶化すること（或はむしろ蛋白の不溶性獲得が変性現象の一に考えられている訳であるが）は、肉蛋白質調製に際して多く経験せられてゐる処であるから、上記の如き諸因子も当然考慮せらる可きであらう。

然し乍ら、腐敗に際しては、塩基性物質の増量に伴い肉の水素イオン濃度の移動も起りその他当初有機態に於て高分子物質に包含せられていた種々の塩類の遊離も考慮する必要がある。これらも又蛋白質の溶出條件に多大の影響を與えるからである。

HgCl₂による沈澱反応を実施する際、この反応に主体的役割を演ずる蛋白質の溶出條件を明かにすることは重要と信ぜられるので、若干の検討を加えることとしたのである。

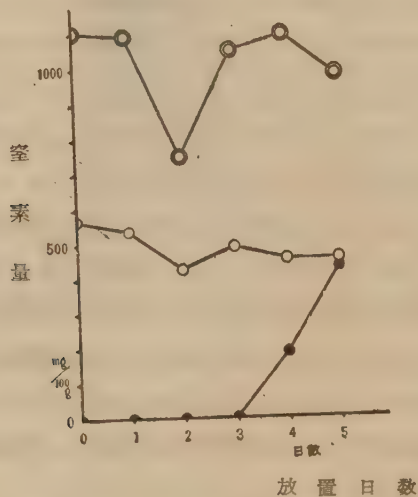
実例としては、第9, 10表のクロカハカジキの腐敗例でも、好氣的腐敗区の2日～5日後の数値に溶出量の減少が認められるが、なお第14, 15表に、クヂラ肉、ビンナガマグロ肉で得られた結果を表示する。これらは鮮肉を室温に放置して漸次腐敗に至らしめHgCl₂並に醋酸々性HgCl₂との沈澱の有無、水溶性全窒素、同蛋白窒素、HgCl₂沈澱窒素、揮発性塩基窒素及びpHを逐日測定したものである。試料中鯨肉は南氷洋産冷凍鯨赤肉（1948.4.10）、ビンナガマグロ肉（1948.4.20）は東京魚市場より入手の体重2.8kgのもので、前者の全窒素3.29%、水分75.6%、後者の全窒素3.73%、水分72.0%で、ビンナガマグロでは血合肉を除いた正肉部のみを使用した。試料採取法、採取量、放置条件等は第9, 10表のクロカハカジキの例と同様に行つた。

第14表 ナガス鯨赤肉の腐敗経過と各種形態窒素量の変化

放 置 日 数	0	1	2	3	4	5
水 溶 性 全 窒 素	1096	1093	755	1066	1096	974
同三塩化醋酸沈澱窒素	578	548	426	496	469	454
同 HgCl ₂ 沈 澱 窒 素	—	—	—	—	182	438
揮 発 性 塩 基 窒 素	13.5	12.1	13.6	22.8	34.0	93.7
A 液 反 応	—	—	—	—	+	+
B 液 反 応	—	—	—	—	+	+
浸 出 液 pH	5.4~5.6	5.4~5.6	5.4~5.6	5.4~5.6	5.8~6.0	6.4~6.6
室 温 C°	15.5	19.0	17.5	17.0	19.0	19.0

第15表 ビンナガマグロ肉の腐敗経過と各種形態窒素量の変化

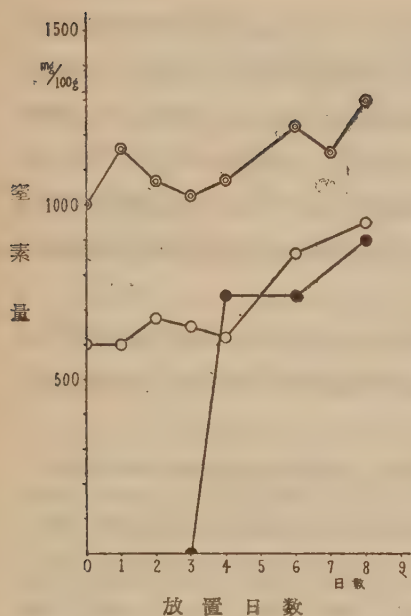
放 置 日 数	0	1	2	3	4	6	7	8
水 溶 性 全 窒 素	998	1156	1058	1021	1058	1210	1134	1285
同三塩化醋酸沈澱窒素	605	605	680	651	636	851	818	927
同 HgCl ₂ 沈 澱 窒 素	—	—	—	—	741	741	848	923
揮 発 性 塩 基 窒 素	15.2	15.2	15.2	20.1	26.0	36.5	46.5	89.2
A 液 反 応	—	—	—	—	+	+	+	+
B 液 反 応	—	—	—	—	±	+	+	+
浸 出 液 pH	5.4	5.4	5.6	6.0	5.8	7.0	7.2	7.0
室 温 °C	16.5	16.5	19.0	16.0	15.0	15.5	19.0	17.5



第2図 ナガスデクラ赤肉の腐敗経過と各種形態窒素量の変化

- ◎ 水溶性全窒素
- 三塩化醋酸沈澱窒素
- 昇水沈澱窒素

第14, 15表から認められることは既述したように揮発性塩基窒素が30mg/1000g 前後に達した時顕著に昇水沈澱を形成する事実と、上記の如く、放置中水溶性窒素量の減少することである。即ち、ナガス鯨赤肉の場合では当初1000mg程度の水溶性窒素が755mgに減少して居り、蛋白窒素も之に伴つて減じている。ビンナガマグロ肉の場合では減少量は少ないが、3日後及7日後に減少点が見られ、蛋白窒素も同様に減じている。



第3図 ピンナガマガロ肉の腐敗経過と各種形態窒素量の変化(記号第2図参照)

を用い、之を約50gの大きさに区分し、大型試験管にトルオール、クロロフォルムと共に收め15°Cの恒温室に2週間放置して、第15日目に至つて減壓下でトルオール・クロロフォルムを可及的に除き腐敗が進行し得るような条件となし、水溶性全窒素の定量と HgCl_2 沈澱生成の有無を検した。腐敗せしめた場合の放置温度は室温である。

第16表 防腐処理2週間放置後の鯨赤肉の腐敗経過と水溶性全窒素

放置日数	0	1	6	7	8	9	10	12
水溶性全窒素	—	—	1133	1110	906	755	1057	1449
A液反応	—	—	—	—	+	+	+	+
B液反応	—	—	—	—	+	+	+	+
揮発性塩基窒素	15	17	19	21	32	52	55	55
浸出液 pH	5.4	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.8~6.0	6.0
室温 °C	—	—	16	19	19	17	15	15

この結果に於ても腐敗過程に水溶性全窒素量の減少する点が認められるから、仮に酵素が関係するとしても、それだけではなく腐敗に隣伴して起る現象であることがわかる。防腐処理中の測定を行つていないので明かではないが、酵素のみの作用であるとすれば、少くとも2週間以内に、その減少点を経過するであろうから、腐敗経過中に起る減少は、一応それと独立した現象でなければならぬと考えられる。

2) 浸出用液の水素イオン濃度と溶出量との関係

この事が肉中の酵素に基くものであるとするならば、特に一定経過日数後に、そのような酵素が活性化すると云う事でなければ説明が困難なように感ぜられる。実験成績の示すように、減少点が不規則に現れることは、(クロカハカジキ及びピンナガマガロの例第9, 15表)むしろ浸出操作中に導入する因子が契機となつてゐる事を暗示するように思われる。

1) 酵素の影響を検定する一つの試み

鮮肉を防腐的に保持することによつて酵素作用を發展させることは蛋白分解酵素をはじめ多くの酵素研究法で頻繁に採用されるところである。仍て上記の如き水溶性窒素量の減少が酵素による作用に基くものであるかを検定する一手段として、クダラ赤肉の凍結製品

魚肉の腐敗過程に於て pH がアルカリ側に移動することはよく知られた事実であるから従つて、魚肉自身の pH の変化に伴つて、肉中の蛋白の溶出量が制限を受けることは当然予想せられる。但し腐敗の場合当初鮮肉の蛋白質が構造上の変化を受ける事なくして維持せられる事は到底あり得ず、腐敗に伴つて崩壊を生ずるから、鮮肉のみの蛋白の性質だけで pH の影響を扱うことは困難であるが、一応初期腐敗の程度では、大きな構造上の変化*がないものと考えて、鮮肉に就て浸出用水の pH を変えた場合の水溶性窒素量の変化をしらべる事とした。

実験試料は鮮度良好なビンナガマグロ肉の正肉部を用いて、その10.0gを100ccのアルカリ添加蒸留水で浸出を行い、濾液中の全窒素並に蛋白窒素の定量を行つた。pH測定はSb電極法(横河製)によつた。

第17表 ビンナガマグロ肉の稀薄アルカリ (NaOH) 液浸出による溶出窒素量の変化

浸出溶液 100ccに含まれる 0.1N NaOH	0	1.0	3.0	5.0	7.0	9.0	11.0	15.0	20.0
浸 出 液 PH	5.57	5.71	6.10	6.37	6.64	6.87	6.90	7.56	7.81
水 溶 性 全 窒 素	1236	1187	1175	1137	1181	1200	1459	1306	1380
三塩化醋酸沈澱窒素	660	660	631	638	630	762	673	660	660
アミノ酸態窒素	78	—	81	126	—	—	132	161	201

窒素量は肉100g中のmg数で示す。

第17表の結果から見ると、純粹の蒸留水浸出の場合に比較して稀薄アルカリ抽出の場合に溶出量が減少する事実が認められる。即ち pH6.3前後に最小点が見られ、以後アルカリ側に傾くに伴い、再び溶出量が高まる。この結果を更に確かめるために別に入手した他のビンナガマグロ肉を用い同様な実験を反覆した結果は第18表の如くである。なお本試料の全窒素4.53%, 同蛋白窒素3.51%である。

第18表 ビンナガマグロ肉の稀薄アルカリ (NaOH) 液浸出による溶出窒素量

浸出用液 100ccに含まれる 0.1N NaOHcc	0	1.0	3.0	5.0	7.0	9.0
浸 出 鮮 pH	5.95	6.05	6.30	6.66	6.80	6.99
水 溶 性 全 窒 素	1343	1394	1820	1468	1468	1609
三塩化醋酸沈澱窒素	748	807	807	807	858	1020
アミノ酸態窒素	140	149	183	160	168	245

窒素量は生肉100g中のmg数で示す。pHはSb電極法による。

この結果は pH6.7前後の位置に最少溶出点があるように見受けられる。この程度の pH

* 浸出液を 50~100°C の各温度に加熱して凝固する蛋白群の組成は若干、鮮度低下では変化する事がある。

変更を興えるために必要なアルカリ濃度は表示の如く0.01N乃至0.005Nの範囲にある。アムモニアの濃度にして0.01N液100ccに含まれる量は35mgであるから、鮮肉100g中30mg前後でpH6.2程度となる事は上記の成績から推定して肯定出来る値である。従つて、30mgのアムモニア生成によつて pH が移動し、その結果、一種のアルカリ抽出となつて、溶出窒素量の変化がもたらされる事は充分考慮してよい因子であると思われる。勿論、pHのみの影響を以て説明する事は妥当を欠くであろうが、異なる等電点を有する蛋白質の混合物として魚肉を扱えば、以上の如き事実から、極く軽度の pH の変化が魚肉よりの溶出窒素量に影響を興え得ることが想像される。茲に浸出液中のアミノ酸窒素量を測定した理由は稀薄アルカリ抽出の場合にも蛋白質の加水分解的崩壊が存在し得る筈であると推定したからであるが、事実蒸留水浸出の場合に比較して若干の増量が認められる。このような微小な変化と雖も HgCl₂ 沈澱形成には、大きな影響を興えるものと予測せられる。

3) 浸出用水中に塩類共存の場合の溶出量の変化

筋肉の溶出窒素量に及ぼす塩類の影響に就ては、かなりの報告があり、蛋白の抽出に適當な濃度は、塩化アムモニウム10%水溶液 (Saxl, 1907), 塩化リチウム7%水溶液 (Smith, 1934) 等があげられ、又、煉製品原料の水晒し処理の立場から魚肉の浸出窒素量と塩濃度との関係を取扱つた福岡、清水、和田らの実験例がある。コヒ肉の場合で蛋白の溶解量は1~2規定食塩水で最大に達し、以後濃度を増すに従つて漸次減少すると述べられているが1%以下の稀薄な塩類共存の場合の実験成績はない。一般に魚類の鮮肉中の灰分は略々1~2%と考えてよいから、水浸出の際に10倍量の水を使うとして、0.1~0.2%の範囲が全灰分が溶出した時の濃度となる訳である。仍つて著者は、鮮肉を使つて、嚴密に作製した0.01~0.1%のKahlbaum 製化学用純食塩溶液で、浸出を行い溶出窒素量の変化を測定した。

試料の全窒素4.14%, 水分70.0%, 揮発性塩基窒素16mg/100gであつた。抽出條件は10.0gを100ccにて抽出、溫度は15~17°Cの室温である。

第19表 マグロ肉の稀薄食塩水溶出による浸出窒素量の変化

NaCl 濃 度 %	0	0.006	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1
水 溶 性 全 窒 素	—	1332	1336	1180	1408	1418	1468	1186
三 塩 化 醋 酸 沈 澱 窒 素	775	775	830	537	815	755	852	653

窒素量は肉100g中のmg数で示す。

この結果から、食塩濃度の増加に伴つて必ずしも溶出量が増加していない事がわかる。なおこの結果を確かめるためにビンナガマグロ肉を用い、同様な方法で溶出窒素量を測定

した結果は第20表の如くである。本試料の全窒素1.83%, 蛋白窒素3.14%である。

第20表 ピンナガマダロ肉の稀薄食塩水浸出による溶出窒素量の変化

NaCl 濃 度 %	0	0.01	0.02	0.05	0.1
水 溶 性 全 窒 素	1329	1671	1579	1441	1365
三塩化醋酸沈澱窒素	594	648	654	766	732

窒素量は肉100g中のmg数で示す。

この表の値からも、食塩の濃度増加と溶出窒素量とが平行していない事がわかり、中性塩の極く微量の所在で溶出窒素量に異動の起る事は明かであると思う。

A) 同一魚肉に就てのNaCl, CaCl_2 及び $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)$ 溶液中に溶出する窒素量

筋肉中の無機成分として石灰塩並に磷酸塩を想定し、これら塩類が魚肉から窒素成分を溶出する量をしらべた。比較的新鮮なワラリの正肉(揮発性塩基窒素24.9mg/100g)を用い10.0g:100ccの比に各種濃度のNaCl, CaCl_2 及び $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)$ の溶液を用いて、22°C 1時間の浸出を行い、溶出せる窒素量を測定した結果は第21表の如くである。

第21表 ワラサ肉を各種塩類溶液で浸出した場合の溶出窒素量

塩類濃度 使用塩類	0.05%	0.1%	0.2%
NaCl	937	1235	1150
CaCl_2	1150	1190	1150
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)$	1040	965	1015
蒸 溜 水	955		

数値は100g中のmg数で示す。

この結果からも塩類濃度の増大と溶出窒素量は必ずしも一致し得ないことが明らかである。

4) 魚肉の腐敗に伴い溶出する水溶性磷酸の変化

上述したように魚肉を水浸出する場合、経過時間と共に溶出窒素量に異動の生ずる現象は單一な理由によつては説明し難く、殊に酵素作用によつて溶出が減少すると云うことはあまり考え得られないことが明かである。著者は鮮度低下と共に増加する無機塩類の影響を想定したが、これら諸要因のうち、魚肉中に腐敗と共に出現する磷酸塩の消長に就て実験を行つた結果を述べる。

魚肉中の全磷酸の量は乾物量に対して2%前後で略々一定していることが知られている。この中、有機態の磷酸が新鮮時に多い事は當爲予想せられるところであるが、Sharp (19

31)⁸³⁾によるとハドツクの氷藏中のクレアチン磷酸の消長をしらべて、死直後に存在したクレアチン磷酸が24時間後には全く消失した例を報告している。Janke及Jirak(1934)⁸⁴⁾は鶏卵の貯藏中の変化の一として、卵黄から卵白へ無機磷酸が移行して漸次その量の増加することを認め、これらの結果を進めてRudolph(1938)⁸⁵⁾は磷酸の量と電気伝導度との関係をしらべて鶏卵の古さを測定する資料としているが、魚肉の腐敗に伴い溶出する磷酸量に就ての報告は少く殆ど見当らないが、最近山田ら(1949)^{16,36,37)}は魚体の死直後の無糖現象を研究、Sharpの報告と同様な所見を出している。又、Foreman及Smith(1928)⁸⁶⁾は肉エキスにStaphylococcus aureusを繁殖せしめた場合の有機態磷が無機態磷に移行する状態をしらべている。

磷酸定量方法は、各種魚肉の細碎したものを各20.0g宛250cc容三角瓶にとり30°Cの恒温器中に放置腐敗せしめ、対照としてはトルオール、クロロフォルムを添加した防腐区を設け、定量に当つては蒸溜水100ccを加え、よく攪拌混和し、20%塩化醋酸を10cc加えて除蛋白し濾液10ccを採つて400倍に稀釋し、その10ccに就てYoungbourg法⁶⁷⁾による磷酸の比色定量を行つた。即ち7.5%モリブデン酸アモモニウム1.0cc、20%硫酸0.1ccを加えたのち、約7分後に0.02%塩化第一錫0.5ccを加えて発色せしめ、蒸溜水を加えて50ccとしたものと磷酸標準液(1.0cc中P0.001mgを含む)に就て同様発色せしめたものとを比色定量した。全磷酸量は魚肉を硫酸及硝酸で濕性灰化した液に就て行い、試料はいずれも東京中央魚市場より購入した新鮮なイワシ、カツラ、イナダ、ホシサメ、スケソウタラである。

A) 各種魚肉の腐敗経過と水溶性磷酸の増量 (鮮肉100g中P₂O₅g数)

第22表 マイワシの腐敗経過と水溶性磷酸の増量

放置 日数	37°C 放置区	37°C放置 防腐区	10°C 放置区	備 考
0	0.44	0.44	0.44	全磷酸0.65%
1	0.45	0.45	0.44	水分 74.46%
3	0.48	0.47	0.44	全磷酸中の水溶性磷酸
4	0.51	0.47	0.45	新鮮時 67%
5	0.51	0.48	0.46	腐敗7日後 84%
6	0.55	0.49	0.47	
7	0.56	0.48	0.49	
8	0.56	0.49	0.50	
10	0.56	0.50	0.52	

第23表 カツヲの腐敗経過と水溶性磷酸の増量

放 置 日 数	37°C 放 置 区	37°C放置 防 腐 区	10°C 放 置 区	備 考
0	0.42	0.42	0.42	全 磷 酸 0.68%
1	0.45	0.43	—	水 分 75.00%
2	0.46	0.45	0.44	全磷酸中の水溶性磷酸
3	0.51	—	0.44	
4	0.53	0.46	0.45	新 鮮 時 63%
5	0.54	0.49	0.46	腐敗7日後 80%
7	—	4.49	0.49	
8	—	0.50	0.49	

第24表 イナダの腐敗経過と水溶性磷酸の増量

放 置 日 数	37°C 放 置 区	37°C放置 防 腐 区	10°C 放 置 区	備 考
0	0.43	0.43	0.43	全 磷 酸 0.62%
1	0.44	0.43	0.43	水 分 75.51%
2	0.46	0.44	0.43	全磷酸中の水溶性磷酸
3	0.46	0.45	0.44	
4	0.49	0.49	0.45	新 鮮 時 70%
6	0.54	0.49	0.47	腐敗7日後 90%
7	0.55	0.49	0.48	

第25表 ホシザメの腐敗経過と水溶性磷酸の増量

放 置 日 数	37°C 放 置 区	37°C放置 防 腐 区	10°C 放 置 区	備 考
0	0.43	0.43	0.43	全 磷 酸 0.66%
1	0.44	0.43	0.43	水 分 76.19%
2	0.46	0.44	0.43	全磷酸中の水溶性磷酸
4	0.49	0.46	0.43	
5	0.53	0.48	0.44	新 鮮 時 65%
6	0.53	0.49	0.46	腐敗7日後86%
7	0.56	0.50	0.48	

これらの結果から腐敗の進行に伴つて水溶性磷酸の増量する事実が明らかであるが、その増加割合は比較的小さく、初期腐敗検出には不適當である。しかし、魚肉の水浸出を行う場合浸出液中に所在する磷酸の量が影響するとすれば、その重量に対して0.4~0.5%の範囲であるから、影響が考えられるのではないかと思う。

B) 水溶性磷酸の増加と揮発性塩基窒素の増量との関係

腐敗過程中に於ける水溶性磷酸の増量が比較的微小であることは上記の諸表からも明らかであるが、これを揮発性塩基窒素の増量と比較した結果は第26表の如くである。試料は

スケソウタラの血合肉を除いた正肉の部分を上記と同様な方法で処理したものである。なおこの際、除蛋白後の濾液10ccに就き10%バリタ液10ccを加え沈澱を除いた液に就ても磷酸の定量を行い、グリセロ磷酸の有無をも検定した。放置温度は30℃の恒温器で維持した。

第26表 スケソウタラの水溶性磷酸の増加と揮発性塩基窒素の増量との関係

放 置 日 数	水 溶 性 磷 酸 量 g/100g	水溶性磷酸量(バリタ処理後) g/100g	揮 発 性 塩 基 窒 素 mg/100g
0	0.47	0.47	27
1	0.51	0.50	84
2	0.52	0.52	273
4	0.54	0.54	756
5	0.55	0.55	782
6	0.56	0.55	960
7	0.56	0.56	1080
8	0.56	0.56	1050
9	0.56	0.56	1230
10	0.56	0.56	1160

この結果で明かなように揮発性塩基窒素の増量が100mg/100g以上に及ばないと磷酸量の増加が顯著にならないこと、又スケソウタラの場合バリタに固定せしめられる磷酸が皆無であることが認められる。

5) 魚肉水浸出液中に含まれる全灰分と溶出窒素量との関係

以上の諸実験によつて魚肉の腐敗に伴つてアムモニアはじめ塩基性物質の如き魚肉浸出液のpHを変更する性質を有する物質の増量、並に溶存塩類の増加等明らかであるが、なほ魚肉水浸出液中の全灰分と、溶出窒素量との関係をしらべることにした。試料はカツヲの正肉を使用して、室温放置中の腐敗経過と変化並に浸出液中の全灰分及び溶出窒素量を測定した結果は第27表の如くである。

第27表 カツヲ肉腐敗過程に於ける溶出灰分と溶出窒素量

放 置 日 数	0	1	2	3	4
水 溶 性 全 窒 素	1640	1640	1580	2195	2200
三塩化醋酸沈澱窒素	750	800	536	560	760
HgCl ₂ 沈 澱 窒 素	—	550	540	550	800
揮 発 性 塩 基 窒 素	24.9	32.4	42.3	71.8	126
水 溶 液 中 全 灰 分	0.85	1.00	0.99	1.05	1.01
A 液 反 応	—	+	+	+	+
B 液 反 応	—	—	+	+	+
pH	5.4	5.4	5.4~5.6	5.8	6.2~6.4
室 温 °C	26~28	27	29	30	29

備 考：水溶液中全灰分は魚肉100g中のg数 窒素量は いづれも魚肉100g中のmg数

第27表から pH は順次5.4から6.4程度まで増大し、溶出全灰分も略々経過日数に応じて漸増する傾向があり、一方水溶性全窒素並に蛋白窒素は中間に於て減少することが明らかである。これは第17表乃至第21表の実験結果から推定出来るように pH 並に塩類濃度が一方方向に増加しても溶出窒素量が必ずしもこれに伴わない事実によつて説明し得るのではなからうか。

V HgCl_2 と結合沈澱する魚肉水溶性蛋白質

第9, 10, 14, 15 表等から魚肉水浸出液と HgCl_2 との間に形成される沈澱は新鮮肉の場合には殆ど起らず、生じたとしても長時間たとへば24時間程度放置後に軽度の濁濁を生ずる程度であるが、魚肉の鮮度低下と共に急激に出現するところに特色の存する事が窺われる。このような現象は新鮮時と鮮度低下時に於ける水に溶解得る蛋白質の種類が全く異なるか、或は当初から存在した蛋白質の構造上の変化による HgCl_2 との反応性高き活性基の出現によるかその沈澱機構は極めて興味のあるところである。水溶性蛋白質が新鮮時に於て HgCl_2 と沈澱を形成せぬと云ふことは、純水可溶の蛋白質所謂アルブミン態の蛋白質が持つ特性のように一応考えられる。一方、塩類又は稀薄アルカリ可溶の所謂グロブリン態の蛋白質であれば新鮮肉のそれと雖も沈澱を生ずるからである。

以下にその実例を挙げることにする。

1) 魚肉の食塩水可溶蛋白質と HgCl_2 との沈澱形成

鮮度良好なマグロ肉10.0gを各100ccの厳密に作製した食塩溶液（Kahlbaum製化学用純食塩を用う）で浸出を行い、溶出した全窒素量及び HgCl_2 沈澱窒素量を測定した。

第28表 マグロ肉を浸出した場合 HgCl_2 と沈澱を生ずるに必要な食塩溶液濃度と沈澱窒素量mg/100g

食 塩 濃 度 %	0	0.006	0.008	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1
水 溶 性 全 窒 素	—	1332	1402	1366	1180	1408	1418	1468	1186
三 塩 化 酞 酸 沈 澱 窒 素	775	775	713	830	537	815	755	852	653
HgCl_2 沈 澱 窒 素	—	—	—	—	—	712	735	840	591

食塩水浸出液中の蛋白質と HgCl_2 との沈澱反応は食塩濃度が0.03%に達するまでは殆ど現れない。浸出液と HgCl_2 液との混液を24時間以上放置する時は軽度の濁濁は認められるようになるが、凝固沈澱は見られず、0.03%に至つて始めて凝固の認められるようになる。この凝固物中の窒素を定量した結果が第28表の如くである。

第29表はビンナガマグロに就ての同様な実験結果であるが、0.02%までは軽微な濁濁以外は起らない。即ち0.03~0.05%に至つて始めて HgCl_2 との沈澱を形成するに至る

第29表 ビンナガマグロ肉を浸出した場合 HgCl_2 と沈澱を生ずるに必要な食塩溶液濃度と沈澱窒素量mg/100g

食塩濃度 %	0	0.01	0.02	0.05	0.1
水溶性全窒素	1329	1671	1579	1441	1365
三塩化醋酸沈澱窒素	594	648	654	766	732
HgCl_2 沈澱窒素	—	—	—	864	661

蒸留水に可溶の蛋白が反応せぬ程度の新鮮な魚肉に於ても抽出液中に少量の中性塩が存在することにより溶出蛋白質の質的相違が起り沈澱をつくるに至るものと推定せられる。これは、浸出液を加熱して生ずる蛋白質凝固像の観察結果（後述XV項）からも充分うなづける事実である。従つて、又、以上の結果からは本沈澱反応を行う際、浸出用水の純度の吟味が必要であつて、蒸留水以外の、例えば海岸地方に多い塩類に富む井水などでは実験に不適当である事が指摘出来る。

2) 牛肉の食塩水可溶蛋白質と HgCl_2 との沈澱形成

前述したように中性塩可溶肉蛋白質が HgCl_2 と結合沈澱する事実は明かであるので、あらかじめ純水に可溶な部分を浸出し去つた残渣に就て食塩水抽出を行い、その浸出液と HgCl_2 との沈澱反応の有無を検定した。

試料は水分67.0%，全窒素3.33%，揮発性塩基窒素16.0mg/100gの市販牛肉を使用した。即ち、脂肪組織を除いたのを細碎して100gを秤取し蒸留水を1l加えて浸出2時間を行い浸出液を濾別し、残渣を1回水洗して後、1%NaCl液1lで浸出2時間を行い、その浸出液を8.5~9.5°Cの冷蔵庫に保持して漸次腐敗に至らしめ HgCl_2 沈澱窒素、三塩化醋酸沈澱窒素を測定した。 HgCl_2 との沈澱は、新鮮時の食塩溶液浸出液に於て顯著に認められた。

第30表 水溶性部分を除いた牛肉の1%食塩溶液浸出液の腐敗経過と HgCl_2 沈澱形成

放置日数	0	1	2	3	5	6	7	8	9
1%食塩水可溶全窒素	—	—	23.45	21.88	—	23.45	21.88	23.76	—
同三塩化醋酸沈澱窒素	17.28	18.76	18.70	16.19	19.71	20.05	15.37	15.04	—
同 HgCl_2 沈澱窒素	17.36	16.80	17.19	20.37	17.81	20.73	21.46	19.76	—
同揮発性塩基窒素	—	0.45	1.13	1.93	1.50	6.79	5.28	7.39	7.55
pH	5.4	5.4	5.6	5.8	—	6.4	6.8	6.8	6.8
HgCl_2 沈澱反応	+	+	+	+	+	+	+	+	+
醋酸性 HgCl_2 沈澱反応	+	+	+	+	+	+	+	+	+

濾液100cc中の窒素mg数、原肉10.0g中に相当する。

この実験結果から、 HgCl_2 と沈澱する窒素形態が殆ど蛋白態であることが確認せられる。即ち、予め水溶性部分を除いた残渣であるために、1%食塩溶液中に溶出した窒素は表の

示すように大部分蛋白態である事が明かであり、三塩化醋酸と HgCl_2 とに夫々沈澱する窒素量も腐敗後期を除いては略々相等しく、 HgCl_2 が蛋白沈澱剤として行動している事がよくうかがわれる。

3) 魚肉の稀薄アルカリ可溶性蛋白質と HgCl_2 との沈澱形成

中性塩可溶蛋白質以外に稀薄アルカリ可溶性蛋白質も又 HgCl_2 との沈澱を容易に形成する。全窒素4.53%, 蛋白窒素3.51%のビンナガマグロ新鮮肉を用い蒸留水に夫々0.1N NaOH液1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0ccを加えて100ccとした稀薄アルカリ液を用い、10.0gの上記マグロ肉を室温で浸出1時間を行い、その濾液10.0ccに就て各種形態窒素を測定した結果は第31表の如くである。これによつて稀薄アルカリ可溶性蛋白質が HgCl_2 と顯著に反応することがわかる。即ち、新鮮肉の純水浸出液のみに反応しないが、中性塩並に稀薄アルカリ可溶のグロブリン系（或はミオシン系）の蛋白質では、魚肉の新鮮度に無関係に反応することがわかる。

第31表 ビンナガマグロ肉の稀薄アルカリ浸出液と HgCl_2 との沈澱形成

浸出用100ccに含まれる0.1NNaOHcc	0	1.0	3.0	5.0	7.0	9.0
浸出液 pH	5.95	6.05	6.30	6.66	6.80	6.99
水溶性全窒素	1343	1394	1820	1468	1468	1609
三塩化醋酸沈澱窒素	748	807	807	807	858	1020
HgCl_2 沈澱窒素	—	837	864	923	968	1086
アミノ酸窒素	140	149	183	160	168	245

4) 魚肉水浸出液のpHと HgCl_2 沈澱の形成

以上の如く稀薄アルカリ抽出の場合は、新鮮肉に於ても昇酸との沈澱反応を形成することが明らかであるが、この現象が抽出せられた蛋白質の質的相違によるものか如何を知るために、一度純水浸出を行つた浸出液に、あとからアルカリを添加してpHを調節し、 HgCl_2 沈澱の有無を検定する実験と、上記の如き当初から稀薄アルカリ抽出を行つて、その浸出液との反応の有無を検定する実験を同一の鯨肉に就て実施した。

A) 浸出後に魚肉浸出液のpHを調節した場合

南水洋産冷凍鯨肉（1948.4.10入手）水分74.3%, 全窒素3.50%のものを10.0g:100ccの比の浸出濾液を作製、この10.0ccに0.1N. NaOH液を一定量宛加えて、夫々終末pHが5.4~8.0となる如くし、次にこれに1% HgCl_2 を加えて沈澱形成の有無をしらべた。

第32表 鯨肉水浸出液に0.1NNaOHを加えpHを調節したのちHgCl₂を加えた場合の沈澱の有無

浸出液10.0ccに加えられた 0.1NNaOHの量	0	0.28	0.55	0.65	0.89
同上添加後 pH	5.4	6.2	7.0	7.4	8.0
1%HgCl ₂ 添加後沈澱の有無	—	—	—	—	—

この結果、pHを変更したのちにHgCl₂を加えても沈澱はつくられず、軽微な濁濁を呈する程度であつた。純水可溶の蛋白質を、普通の分け方から仮にアルブミン態の蛋白質とするならば、このものはHgCl₂との顯著な沈澱をつくらないものの如くであり、この液のpHをアルカリ側にもたらしても、なお沈澱を生じないと云う事実は、一つには蛋白質の質的相違に基くとも云い得られると思う。

B) 浸出時にpHを調節した場合

前記と同じ鯨肉の10.0gを用い0.1N NaOHを蒸留水100ccに7.0ccの割合で加えた、稀薄アルカリ液100ccで所定の如く浸出すると、大体pH6.2~6.4の浸出濾液が得られる。所謂グロブリン様蛋白質を溶出せしめた場合である。この濾液中の蛋白質はHgCl₂によつて顯著に固定せしめられる。濾液のpH6.2~6.4とした理由は、初期腐敗時の魚肉のpHに近似せしめる爲である。

第33表 鯨肉を稀薄アルカリ浸出した場合と蒸留水で浸出した場合のHgCl₂沈澱形成の相違

各形態窒素 mg/100g	0.1NNaOH 7.0cc 加蒸留水浸出 濾液	蒸 留 水 浸 出 濾 液
水 溶 性 全 窒 素	813	1010
三 塩 化 醋 酸 沈 澱 窒 素	600	540
HgCl ₂ 沈 澱 窒 素	517	0
揮 発 性 塩 基 窒 素	—	13.5
HgCl ₂ 液 沈 澱 反 応	+	—
醋 酸 々 性 HgCl ₂ 沈 澱 反 応	+	—
浸 出 液 pH	6.4	5.4~5.6

その結果と、同じ試料の純水可溶部分との比較は第33表に示される。

以上の結果から同一鮮度の鯨肉に於ても稀薄アルカリ可溶のグロブリン系蛋白質の方が純水可溶のアルブミン系蛋白質よりも、HgCl₂との沈澱形成が容易であることを示す。即ち腐敗による鮮度低下の獣魚肉では、それ自身塩基性となり、蒸留水浸出が恰も稀薄アルカリ浸出と同様な効果と興えるため、水溶性蛋白質が質的に異なるものとして抽出せられ、

HgCl₂ との沈澱反応を起すことになるであろう、また、他方、腐敗に伴う蛋白質自身の崩壊の結果 HgCl₂ と結合し易き活性基の出現によつて、沈澱を生ずる事も考え得られる。

5) 純水可溶性蛋白質の腐敗とHgCl₂の沈澱の形成

純粋な水に可溶性の蛋白質が HgCl₂ と沈澱を呈さないのである、それは原肉の新鮮な際にのみ見られることは屢々述べた通りである。上述の如く、浸出に純水を用いても、事実上稀薄塩類溶液乃至は稀薄アルカリ溶液とならざるを得ないことも確かにこの沈澱形成の一理由としてよいであろう。しかし、それは必ずしも純粋な水可溶性蛋白質が常に HgCl₂ 沈澱を形成せぬことの理由とはならない。グロブリン系蛋白質の HgCl₂ 沈澱性は既述の如く明らかであるが、純水可溶性のものであつても、腐敗による構造上の変化がもたらされる場合には HgCl₂ との沈澱も可能になり得る筈である。即ちこの沈澱性がグロブリン様蛋白質の特質と云う事ではなくして他の蛋白質でも HgCl₂ との反応を提起する活性基が出現しさえすれば充分沈澱し得るのではないかと考えられる。

仍て水浸出濾液を多量に作製し、これをその儘放置して腐敗に至らしめ、その間の蛋白質窒素の変化を追ひ、HgCl₂ との沈澱形成の関係を検討することとした。

試料は水分67.0%, 全窒素3.33%, 揮発性塩基窒素16. mg/100g の市販牛肉を用い、脂肪を除いた100g を細碎、蒸留水 1 l で2時間浸出を行い、その濾液を大型三角瓶に収めて綿栓を施し、8.5~9.5°C の冷蔵庫に保管し、逐日その10.0cc をとり HgCl₂ 沈澱窒素、蛋白質窒素、揮発性塩基窒素、pH を測定した。この場合、8.5~9.5°C の放置温度を選んだ理由は腐敗を急速に進行せしめて揮発性塩基窒素の極端な増加を來して pH をアルカリ側にもたらしことを避け、後述するところの本沈澱形成機構が蛋白質分子の荷電の状態如何にかどうかを検定する目的をも含めたからである。

第34表 牛肉水浸濾出液の腐敗経過と HgCl₂ 沈澱窒素の変化 (濾液100cc中の N mg, 原肉10.0g に相当する)

放 置 日 数	0	1	2	3	5	6	7	8	9
水溶性全窒素	81.30	81.61	82.39	82.08	—	79.73	78.18	78.16	—
蛋白質窒素	42.99	49.10	47.53	49.78	48.76	45.43	40.75	40.75	—
HgCl ₂ 沈澱窒素	—	—	15.62	38.09	55.17	48.11	59.84	56.49	—
揮発性塩基窒素	0.37	2.14	2.3	3.4	3.2	6.8	5.3	4.5	—
pH	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	6.0	6.8
HgCl ₂ 沈澱反応	—	±	+	+	+	+	+	+	+
鹼酸性 HgCl ₂ 沈澱反応	—	±	+	+	+	+	+	+	+
浸出液観察	鮮紅色	暗赤色	腐 臭		チヨコレ ート色		褐 色	黄色沈 澱物	

第34表の結果から当初 HgCl_2 と反応性のなかつた肉水浸出液が、浸出液自身の腐敗と共に顯著に沈澱を形成するようになり、その量も蛋白態窒素量と同量以上であることが知られる。従つて、この沈澱現象は塩類、アルカリ等に可溶の蛋白質が有する特質でなくして、純水可溶性の蛋白質に於ても、その構造上の変化が起れば、充分反応性を生ずる事が分る。この場合では恐らく腐敗によつて蛋白質分子の開展 (unfolding) を生じ、蛋白質分子内部にあつた作用基が外部に向つて露出したためではないかと思われる。このような推定を裏づける事実は後章で更に詳説する。また、沈澱を形成せぬ時の浸出液の pH があまり変化なく維持せられているにも拘らず、腐敗に従つて顯著に HgCl_2 と沈澱を生ずる事実は、蛋白質分子の荷電の状況だけが、金属塩との結合を決定する唯一の要因ではあり得ないことを暗示するものと思われる。これに関しても後述する際、詳論したい。(VIII, IX項)

6) ゼラチン溶液の腐敗と HgCl_2 沈澱の形成

比較的純粋に得られる水溶性蛋白質のモデルとしてゼラチンを選び、その3%溶液を放置腐敗せしめ、前記と同様の目的を以て、腐敗経過と共に HgCl_2 と沈澱形成を行うか如何を実験した。

先ず使用ゼラチンの精製を行い、精製後のものに就て3%液を作製した。即ち、培養基用板状ゼラチン 11.6g に蒸留水 200cc を加え、氷醋酸を用いて pH 4.7 (ゼラチン等電点) となし、1時間放置する。これをよく洗い再び 200cc 蒸留水に浸漬し、 $\frac{M}{50}$ 液となるよう濃 NaOH を加え (約 0.8cc) 時間放置する。ゼラチンは膨潤を呈する。更によく洗い、中性としたのち、200cc の蒸留水を加え、醋酸で pH 4.7 とする。ゼラチンは再び収縮して表面に皺を生ずる。これを 44 時間その儘放置したのち、中性となし、よく洗滌し、次に水をよく除き濾紙上に漉くひろげて、硫酸デシケーター中で乾燥する。乾燥後の水分 51.32%、このゼラチンを 3.0g 秤取し、水を加えて 100cc となし、湯浴上にて 95-98°C で 15 分間加熱溶解せしめ、これを濾過して濾液に就て次の如き反応を検した。

第35表 3%ゼラチン溶液の HgCl_2 に対する反応その他

反 応	所 見
HgCl_2 反 応	溶液 10cc に 1% HgCl_2 5.0CC を加えて — 同上を HCl 酸性としても HgCl_2 にて — 同上を醋酸々性としても HgCl_2 にて — NaOH 存 在 下 で も HgCl_2 にて —
ビユーレット反応	陽 性 を 呈 す
20% HClO_4	1.0cc に て 白 濁 す る
50% CCl_3COOH	3.0cc に て 少 し く 沈 澱 を 生 ず る
Nitropruside 反 応	—
赤血塩還元力	—

以上の如く HgCl_2 との反応がゼラチン溶液の場合全く陰性である事を確かめ得たので次にこの溶液を三角瓶に収めて綿栓を施し、 30°C の恒温器に維持して腐敗に至らしめ、その経過に応じて各種形態の窒素量を測定した。

第36表 ゼラチン溶液の腐敗と HgCl_2 沈澱形成

放 置 日 数	0	9	10	14	15
液 中 全 窒 素	392	386	412	414	476
三塩化醋酸沈澱窒素	139	70	0	0	3
HgCl_2 沈 澱 窒 素	0	39	60	101	126
PWS 沈 澱 窒 素	—	378	252	336	333
pH	5.4	5.6~5.8	5.8	5.8	5.8

備 考：窒素量は溶液 10cc 中の mg 数

第36表の実験では放置時間が長かつたため溶液が濃縮せられ全窒素量も終期に多くなつてゐるが、当初存在しなかつた HgCl_2 沈澱が腐敗の経過と共に生成することが認められる。三塩化醋酸による沈澱物はコッセルザート様の凝固物であるが、 HgCl_2 のそれは白色を帯びた沈澱である。このような例から完全に水溶性の蛋白質でもその腐敗過程に於て HgCl_2 との反応性を生ずることが明かである。

VI. 魚肉水溶性蛋白質の荷電と HgCl_2 沈澱の形成

蛋白質の塩類その他試剤による沈澱現象に就て考えられる最も普遍的な解釋は蛋白質がその等電点（若くは等電域）を境界として、酸性側では正に、アルカリ側では負に荷電⁷³⁾しているために、その pH に応じて反対イオンが加えられた場合、放電し、沈澱するともう考へ方である。Bergmann⁷³⁾ 或は Michael^{74,75)} らは金屬錯塩を使用して蛋白質を落す際、等電点より酸性にした蛋白は負イオン錯塩、例えばクローム修酸イオン $[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]^{3-}$ で沈澱し等電点よりアルカリ側に於て正イオン錯塩、例えばクローム尿素イオン $[\text{Cr}(\text{CO}(\text{NH}_2))_3]^{3+}$ で沈澱することを証明して沈澱機構の大部分が、蛋白質と沈澱剤との反対イオンの放電中和による一種の塩形成であることを述べ、しかもこの間蛋白質自身の変性を伴わないことを主張している。この事は pH を変更することによつて、又は pH を変更せしめる際使用する試剤によつて蛋白質分子の構造上の変化がない限り事実であると云える。

然し乍ら腐敗経過にある蛋白質では分子構造上の変化が起るものと見なくてはならないから、單に純粋抽出を行つた特定蛋白質を異なる pH の下に觀察した場合と同じ機構が成立つとは必ずしも限定出来ない。事実、第32, 33表に於て鯨肉で觀察した如く水浸出液の pH をアルカリ添加によつて変更しただけでは沈澱を生ぜず、はじめから鮮肉をアルカリ浸出

を行い終末 pH をそれぞれ高めて行つた場合、沈澱が顯著に見られた例を挙げたが、これは抽出せられた蛋白質の相違に基くものであると同時に、少くとも副生するアミノ酸増量に示されるように、蛋白質表面の活性化した作用基の有無が影響しているものと考えられる。

又、重金属塩の沈澱形成の場合は、金属の種類によつて沈澱現象の著しく異なることも注意されなければならない。例えば醋酸鉛の如き金属塩では新鮮時の魚肉浸出液でも沈澱をつくる事が出来、 FeCl_3 、 FeSO_4 等も又同様である（第37表）。これらの金属塩もその金属イオンが正に帯電し同じく2價である点では相違がないのであるから單に蛋白分子の帯電状況如何によると云うことだけででは説明が困難のように思われる。第37表はビンナガマグロ肉を冷蔵庫（約 10°C ）に保持し、腐敗経過に応じてその10.0g:100ccの水浸出濾液をつくり、各塩類の1%溶液についての沈澱反応の有無を検定した結果である。

第37表 ビンナガマグロ肉の腐敗経過と各種金属塩1%溶液の沈澱反応

使用試剤	同溶液 pH	0	1	2	3	4	5	7	8
HgCl_2	4.4~4.6 B.C.G	—	—	—	—	—	±	+	+
醋酸々性 HgCl_2	4.0~4.2 B.P.B	—	—	—	—	—	—	+	+
FeCl_3	1.6~1.8 T.B	±	±	±	±	±	±	+	+
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	1.6~1.8 T.B	+	+	+	+	+	+	+	+
FeSO_4	2.4~2.6 T.B	+	+	+	+	+	+	+	+
ZnSO_4	2.6~2.8 T.B	—	±	±	±	±	+	+	+
$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	5.6~5.8 M.R	+	+	+	+	+	+	+	+
CuSO_4	4.0~4.2 B.P.B	—	—	—	±	±	±	+	+
MgSO_4	5.0~5.2 B.C.G	—	—	—	—	—	—	—	—
AgNO_3	4.8~5.0 B.C.G	—	—	—	+	+	+	+	+
浸出液 pH		5.6	6.0	5.8	5.8	5.8	6.0~6.2	6.2~6.4	6.8~7.0
魚肉揮発性塩基窒素 (mg/100g)		18.9	13.6	15.1	15.1	18.9	25.7	30.9	108

この表で HgCl_2 沈澱反応に稍共通な態度を示すものは HgCl_2 、 CuSO_4 、 AgNO_3 、 ZnSO_4 等である。 Fe の塩類濾液は夫々 pH が強い酸性であるために、その影響も考えられるが $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ の如き pH5.6程度で寧ろ HgCl_2 より中性に近いが顯著に沈澱する例である。

又、原子價の異なる同種塩類の蛋白質沈澱効果を検討した。試料はビンナガマグロの普通肉部を用い、 30°C に放置して腐敗に至らしめ、新鮮時並に腐敗時に、その10g:100ccの水浸出液と、各1.0%の FeCl_3 、 FeCl_2 、 HgCl_2 及び HgCl_2 との沈澱反応を検した。この4種の金属塩溶液のうち、 HgCl_2 は最も難溶性であるので、液底に同塩の結晶の残留するような飽和溶液を用いた。実験結果は次表の如くである。

第38表 ビンナガマダロ肉の腐敗経過と1%FeCl₂, FeCl₃, HgCl₂, HgNO₃, HgCl₂,
溶液の沈澱反応

放置日数 (30°C)	0	1	2
HgCl ₂	—	—	—
HgNO ₃	+	+	+
HgCl ₂	—	—	+
FeCl ₂	±	±	+
FeCl ₃	+	+	+
試料肉の揮発性塩基窒素	7.7	18.5	122
pH	5.75	5.81	8.00

HgCl₂ の場合は既述の如く、腐敗に至つて顯著に沈澱を與えるが、HgCl₂ は全く沈澱を示さない。これはHgCl₂の難溶性(20°Cに於ける100g 中の溶解量0.000038g)によつて、観察し得る程度の反応に達しないためと思われる。同じく1價の水銀塩(HgNO₃)は新鮮時に既に反応を呈し、灰黑色の濁濁を呈する。FeCl₃の場合は新鮮時と雖も顯著に沈澱を生ずるが過剰のFeCl₃は一旦生成した蛋白沈澱を再溶せしめる。

沈澱形成時、並に生じた沈澱の消失時の1% FeCl₃量と浸出液との混合比並にその時に於けるpHは次表の如くなる。

第39表 ビンナガマダロ浸出液と1% FeCl₃との混合比と沈澱形成の有無

放置日数			0			1			2		
浸出液 1.0cc に対する1% FeCl ₃ 添加量	pH	沈澱の 有無	0cc	pH5.8	—	0cc	pH5.8	—	0.0cc	pH8.0	±
			0.2cc	pH4.4	+	0.2cc	pH4.6	+	0.2cc	pH5.6	+
			0.3cc	pH2.8	±	0.3cc	pH2.8	±	0.5cc	pH3.6	+
			0.4cc	pH2.6	—	0.4cc	pH2.6	—	0.6cc	pH2.8	±
									1.0cc	pH2.2	±
									2.0cc	pH2.2	±

* 浸出濾液が濾紙通過後も濁濁を呈する。

FeCl₃液も酸性が強いために、過剰に添加した場合は生成した沈澱が消失する。従つて1% FeCl₃液を一定量採取して、魚肉浸出液を数滴滴下せしめた程度では、新鮮時、不鮮時共に沈澱の形成は認められない。

次にFeCl₂の場合に就て第39表と同様な定性試験を行つてみると、第40表の如くなる

第40表 ビンナガマダロ浸出液と1% FeCl₂との混合比と沈澱形成の有無

放置日数			0			1			2		
浸出液 1.0cc に対する1% FeCl ₂ 添加量	pH	沈澱の 有無	0	pH5.8	—	0	pH5.8	—	0	pH8.0	±
			0.2	pH5.5	±	0.2	pH5.5	±	0.2	pH6.2	+
			1.0	pH5.5	±	1.0	pH5.5	±	0.5	pH5.6	+
									1.0	pH5.6	+
									2.0	pH5.6	+

この結果を見ると、 FeCl_2 の場合では HgCl_2 、 CuSO_4 、 AgNO_3 等の2価金属塩と類似の反応を呈する如く見受けられるが、新鮮時の濁濁形成がかなり著しいので、沈澱形成と濁濁状態との判別が確実でない憾みがある。 FeCl_2 と FeCl_3 及 HgCl と HgCl_2 の例のように同一金属では價数の増加に応じて、蛋白沈澱能が強まるように認められるが、これが一般的に多価金属イオンの方が沈澱能が大であると云う結論に導けないのは HgNO_3 の沈澱例及び後述するVIII, 2Dの AlCl_3 の例外からも明かであると思う。

他の蛋白沈澱剤としては第41表の如きものを試みたが、いずれも揮発性塩基窒素15~17mg/100g程度の新鮮なビンナガマグロ肉の10.g:100cc 浸出濾液で顯著に沈澱を生ずる事がわかる。

第41表 新鮮ビンナガマグロ肉浸出液と蛋白沈澱剤との反応

沈 澱 剤	沈 澱 の 有 無
ピクリン酸飽和溶液	+
0.5% 燐タンゲステン酸	+
20% スルフォサリチル酸	+
10% タンニン酸	+

1) 新鮮魚肉水浸出液を用いてのpH調節による HgCl_2 沈澱の消失

揮発性塩基窒素8.5mg/100gの極めて新鮮なマグロ肉を使用し、10.0g:100ccの浸出を行う際、アルカリを加えて浸出液の終末pHが HgCl_2 沈澱を充分起す程度とした。このために0.1N NaOH 7.0ccに水を加えて100ccとした液で肉10.0gを浸出し、pH6.8の浸出濾液を得た。この液に就て HgCl_2 沈澱窒素量を測定し、次にこの浸出液に氷醋酸を滴下してpH5.4に戻しこの両液に就て HgCl_2 沈澱窒素量を測定した結果は第42表の如くである。

第42表 マグロ肉の稀薄アルカリ浸出液のpH調節と HgCl_2 沈澱の消失

浸出液中全窒素	1246
三塩化醋酸沈澱窒素	885
pH 6.8に於ける HgCl_2 沈澱窒素	938
pH 5.4に於ける HgCl_2 沈澱窒素	0

備考: 100g 中 mg 数

此の表の示すように新鮮魚肉の稀薄アルカリ浸出液はpH5.4までに酸性領域にもたれば沈澱を生じない事がわかる。このように酸性領域に於て HgCl_2 との沈澱量の減少する事実は卵白に於ても認められた。即ち市販鶏卵の卵白(pH9.4~9.6)を用い、これに10倍量の蒸留水を加え濾過し、濾液そのままのものと、これに醋酸を加えてpH4.2~4.4としたものの2種の卵白液に HgCl_2 を加えて生成する沈澱物中の窒素量は第43表の如くである。

第43表 卵白溶液の PH 調節と HgCl_2 沈澱窒素量の変化

卵白溶液中全窒素	850
同三塩化醋酸沈澱窒素	820
pH9.4~9.6に於ける HgCl_2 沈澱窒素	720
pH4.2~4.4に於ける HgCl_2 沈澱窒素	200

備考：100g 中 mg

第43表の結果からも、醋酸々性にする事によつて、 HgCl_2 との反応性を失う蛋白質の所在する事は確かであるが、これが蛋白の荷電状況の変化によるものか、又はそれら活性基が醋酸によつて封鎖されるかは明かでない。然し、醋酸が完全にすべての HgCl_2 結合性の基を封する事も考え難いから、少くとも一部は荷電状況の如何も関係するものと思われる。

2) 腐敗魚肉水浸出液を用いての pH 調節による HgCl_2 沈澱の形成

上記の例では新鮮魚肉の稀薄アルカリ浸出による浸出液を酸性側に移動せしめて、 HgCl_2 の沈澱消失を認めたのであるが、腐敗により魚肉自身の pH がアルカリ側に偏つたものを再び酸性に戻した例に就て述べる。

揮発性塩基窒素が200mg/100g に達したワラサの腐敗肉を用い、10.0g : 100ccの浸出を22°C にて1時間行い、pH 6.8の濾液を得た。この液中の HgCl_2 沈澱窒素量と、この液に上記同様醋酸を加えて pH 4.8 に至らしめたものの HgCl_2 沈澱窒素量とを比較した結果は第44表の如くである。

第44表 腐敗ワラサ肉浸出液の pH 調節と HgCl_2 沈澱窒素量 (mg/100g)

	pH	HgCl_2 沈澱窒素量
ワラサ浸出液原液	6.8	892
上記を醋酸々性となした液	4.8	809
原肉の揮発性塩基窒素		200

第44表の結果を見ると pH を酸側にもたらしめても第42表で見られるような HgCl_2 沈澱消失の現象はなく HgCl_2 沈澱窒素量は僅かに減少するだけであつて殆ど大差はない。新鮮時と異り腐敗魚肉に於ては蛋白分子の荷電の影響よりも寧ろ腐敗による蛋白分子の崩壊に伴い HgCl_2 と結合し易き活性基の出現が多量となり、それが溶液中の水素イオン濃度とは関係なく HgCl_2 と結合を呈するものと思われる。この場合、問題となる事は魚肉水浸出液に含まれる蛋白質の等電点であるが、後章に述べるように腐敗と共に中性側に移動することが明かであるから第44表に於ける実験は pH 4.8 で当然等電域より酸側である筈であり、従つて單なる荷電の影響だけであるとすると沈澱の減少若くは消失を見なければならぬ訳である。

又、醋酸を加えるような人為的な pH 調節を行わない例として、例えば第34表の牛肉水浸出液を放置腐敗せしめた場合、液の pH は8.5~9.5°Cの放置温度に於て約1週間、当初の pH5.4を維持しているにも拘らず、 HgCl_2 に沈澱せしめられる窒素量は液に含まれる蛋白窒素量に匹敵する程増加している点なども注意せらる可きであろう。即ち第5日目の HgCl_2 沈澱窒素量が pH5.4に於て55mg/100cc、第8日目のそれが pH6.0にて56mg/100ccであつて、pHの変動に関係なく沈澱現象が生起している訳である。

以上から、新鮮魚肉の水溶性蛋白質では、溶液の pH の変化によつて HgCl_2 との沈澱の有無を生じ、それは或る程度在來考えられているような蛋白分子の荷電の影響を含んでいるものと思われるが、他面腐敗魚肉の場合は蛋白質の低分子化に伴う HgCl_2 親和性の基の出現がこの現象を左右するものの如くである。

従つて HgCl_2 液を A 液とし、醋酸々性 HgCl_2 液を B 液として沈澱出現の有無を検定することは、原肉蛋白質の崩壊の程度を簡易に識別することとなり、有力な判定法となり得ると思う。即ち極く初期の鮮度低下に於ては蛋白質の構造上の変化が少く従つて單な pH 調節によつて HgCl_2 との反応を制御出来るからである。更に換言すれば HgCl_2 との反応が單なる pH 調節によつて減退せしめられるような水溶性蛋白質——乃至はそれを含む魚肉は新鮮であると云う事になり、沈澱の抑止が困難であるような蛋白質乃至はそれを含む魚肉は不鮮である事が推定され得るからである。

3) 2 價水銀塩の蛋白沈澱能の比較

魚肉水溶性蛋白質の沈澱現象に Hg^{++} イオンが主体的役割を果たすとすれば、同一 2 價水銀塩で、溶解度並に解離度の異なる HgCl_2 及び $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ を使用して沈澱を試みた場合それらの持つ陰イオンにはあまり関係なく沈澱が起らなければならないであろう。

0.05N HgCl_2 、 $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 液3.0cc に各種鮮度低下魚肉浸出液を滴下、沈澱の出現状況をしらべた結果は第45表の通りである。

第45表 HgCl_2 並に $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ の蛋白沈澱能

魚 種	0.05M HgCl_2	0.05M $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
メカジキ	+++	+
ワラサ	+++	+
ビンナガマグロ	+++	+
カツラ	+++	+
サバ	+++	+
ナガスクチラ	+++	+

又、揮発性塩基窒素54mg/100gの鮮度低下ビンナガマグロ肉水浸出液10.0ccに就て0.05

Mの HgCl_2 及 $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ で沈澱せしめた窒素量を比較した値は第46表の如くである

第46表 ビンナガマダロ肉浸出液中の昇汞並に醋酸水銀沈澱窒素量 (mg/100g)

水 溶 性 全 窒 素	1516
HgCl_2 沈 澱 窒 素	874
$\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 沈澱窒素	759

これらの結果で明かなように同一の水銀イオンに於ても蛋白質沈澱能に相違があり、しかも溶解度のより小さい HgCl_2 の方が沈澱量が多い事実は沈澱機構が單純なイオンの結合だけでは説明し得ぬ点であろう。

VII. 鮮度低下魚肉水溶性蛋白質と HgCl_2 との結合様式

同一魚肉水浸出液に対する HgCl_2 及び $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ の沈澱程度が相違すると云う事は解離している Hg^{++} イオンそのものが蛋白質と結合すると云うよりも寧ろ水銀塩そのものの特異性例えば錯塩形成能力の如き特質に基く現象であり、分子全体としての結合が行われるのではないかと云う推定が可能になる。

そこで魚肉水浸出液と HgCl_2 との沈澱物中の Hg 及び Cl を定量することによつて、この推定を確かめる事とした。

試料はカツヲ細碎肉約 500g を 26~30°C の室温に放置、揮発性塩基窒素量 119mg/100g の鮮度低下肉たらしめ、その 200g を秤取、1l の蒸留水で 1 時間浸出後濾過し、濾液 500cc を採取、この液に 0.05M HgCl_2 200cc を加えて沈澱を生ぜしめ、一夜放置後遠心して上澄を除き、蒸留水による浮揚洗滌を 5 回行い、上澄液中の Hg 反応が H_2S による検定で消失するに至つて、沈澱を集めてデシケーターにて乾燥し、乳鉢で細末としたものを用いた。

塩素の定量は次の如く行ふ。即ち試料中に存在する Hg が指示薬クロム酸加里と反応して赤棕色を示し、滴定の終末点を不明ならしめるので、Hg を除去するために、試料に 5% 炭酸ソーダを加え、充分濕潤ならしめたのを乾燥し、これを加熱炭化した。このものを蒸留水抽出を行い、その液に就て常法による硝酸銀を用うる塩素定量を行つた。盲驗として、既知量の HgCl_2 に魚肉を混和し、上記の如く炭化、Cl の定量を行つた結果、理論値に一致することを認めた。Hg 残存の有無は、 NaOH 、 KI 、 K_2CrO_4 等で確かめた。粉末試料採取量は 100mg である。

水銀の定量は試料 100mg をキエルダール・フラスコに採り、 KMnO_4 2g、濃硝酸 10cc を加え常温に約 20 時間放置後、蒸留水 50cc を加えて還流冷却器下で加温し、蛋白その他の有機物を分解し、分解後同液を濾過、水洗し、濾液並に洗液を合したものに、硫化水素を通じて水銀を落し、硫化水銀の沈澱を濾別して、沈澱を水で洗滌後、N/10 沃度液 10.0cc を

加えて酸化を行わしめ、残余の沃度を二硫化炭素を指示薬として N/10 チオ硫酸ソーダで滴定し、相当する Hg (N/10 沃度 1.0cc=0.01003g Hg) を計算した。

測定値は粉末試料 100mg 中第47表の如き結果となつた。

第47表 カツラ鮮度低下肉水溶性蛋白質のHgCl₂ 沈澱物中のHg及Cl量

Hg 量 mg	Cl 量 mg	Hg : Cl (原子数の比)
10.73	3.6	$\frac{10.73}{200} : \frac{3.6}{35.5} = 0.0536 : 0.1014$

測定値を Hg 及 Cl の原子量で除した値、即ち、原子数の比は表示した如く略々 1:2 で HgCl₂ の割合に一致する。従つて、HgCl₂ による沈澱形成の場合は沈澱物中に HgCl₂ の形で参加することが多いのではないかと考える。即ち Hg⁺⁺ イオンと蛋白との塩形成と云うことでは説明が困難なように思う。但し、固-液界面に於ける吸着現象では分子吸着以外にイオン吸着が考えられ、イオン吸着の場合に於て正負両イオンが分子構成の比で吸着される事もあり得る。そのような場合では、イオン吸着でありながら、見掛上分子吸着の如き観を呈する訳であるから、昇灰沈澱反応の場合も仮に吸着現象として取扱わねばならぬ事実が見出されたならば、この点を考慮せねばならないであろうが、HgCl₂ 溶液中には Hg⁺⁺ イオンの含有量が極めて少い事実が知られているから、先ずイオン吸着が分子構成の比で行われる可能性は極めて少いと見てよいであろう。

VIII. 魚肉水溶性蛋白質の安定性と HgCl₂ 沈澱の形成

前項に於て新鮮魚肉の水浸出液中の蛋白質が HgCl₂ その他の特定の金属塩と何故沈澱反応を興えないかに就て蛋白質の持つ荷電状態の点から検討を試みた。純粹に近い状態に調製を行つた蛋白質を水溶液とした場合と異り、種々の物質の混和物である魚肉の水浸出液に於ては或る特定の理由だけで沈澱反応の生起の有無を論ずることは困難であるが、この現象に就て蛋白質の荷電以外の因子でなお考慮すべき点があるように思う。その一つは蛋白質分子の水溶液中に於ける安定性である。

水溶性蛋白質が安定であるかどうかは、要するに蛋白質分子と水分子との結合の強弱に依存すると考えられるから、加熱或は脱水操作等によつて蛋白質が水溶液中から析出するかどうかを調べることも、安定性を窺う一方法であろう。

魚肉の鮮度低下に伴つて肉中の蛋白質の変性若くは崩壊を生ずるものとすれば蛋白質構成單位であるアミノ酸中の非極性基の増加も当然予想せられる。即ち、蛋白質分子が水分子と相接する境界に於て疎水性の非極性基が増加すれば、水和性の減少はこれに伴う筈で

ある、勿論、親水性の極性基群も、その数に於て増加する事は当然であろうが、非極性基の極性基に対する割合が多いであろうことは普通アミノ酸中の CH_3 基と NH_2 基との比から考えても無理な推定ではないと思われる。

従つて C_6H_5 基の如き疎水性群が増大すれば、蛋白質分子の水和力の減少することも起り得る筈である。

仍て脱水劑としてエチルアルコールを用い魚肉水溶性蛋白質の水和性の減少と鮮度低下との関係、並に HgCl_2 共存の場合の水和性減少の状態を判定することとした。

1) 魚肉の鮮度低下とアルコールによる水溶性蛋白質の凝固

蛋白質がアルコールによつて凝固する現象は古くから知られているが、鮮肉中の蛋白質のアルコールによる凝固が新鮮度との関係に於て調べられた例は少いと思う。著者は、一定濃度のアルコールに魚肉水浸出液少量を滴下する方法と、同じく少量の魚肉水浸出液を無水アルコールを順次加えて凝固の出現を見る一種の滴定方式の二方法を考案して、この関係を数量的に表現し得る事を見出した。

A) 各種濃度のアルコールに魚肉水浸出液を滴下した場合

鮮度の異なる魚肉中の水溶性蛋白質の水和性を脱水劑の濃度を変えて、凝固の生ずる時の濃度で比較する実験を行つた。即ち各種濃度のアルコール液に少量の魚肉水浸出液を落して、濁濁乃至は沈澱を生ずる時のアルコール濃度を記録する方法である。

東京魚市場より購入したマサバ (410~490g) の正肉部並に血合肉を採取、各50g宛を大型試験管に入れ共栓を施し、約 20°C に放置し、実験時に 50g を細碎、そのうち 10.0g を蒸溜水 100cc を以て 1 時間浸出せる濾液 0.1cc をメスビベットを用いて各 10cc の夫々の濃度を有するアルコール中に滴下し、濁濁乃至は沈澱の出現を連日観察した。この場合滴下量を 0.1cc とした理由は浸出液中の水分が規準アルコール濃度に大きな変化を與えないようにするためである。各種濃度アルコールは無水酒精を蒸溜水で稀釋調製した。試験管は徑 15mm 高さ 160mm 前後のものを選び観察は滴下された浸出液がアルコールと混じた部分で濁濁するかどうかにあつたが、多くの場合、濁濁後は凝固物となり試験管底に沈降した。第48表は実験結果であるが、新鮮な魚肉の水浸出液では凝固蛋白質の出現に 70% の濃度を要し、鮮度低下に依つて 50% 乃至 40% で充分であることがわかる。即ち、 HgCl_2 沈澱反応陽性となつた場合の水和性が著しく低下している訳である。又、血合肉の水浸出液に於ても鮮肉の場合の安定性は普通肉と大差のないことが認められた。

第48表 サバ肉の鮮度低下と水浸出液中の蛋白凝固に要するアルコール濃度

放 置 日 数	0		1	2
アルコール濃度%	普 通 肉	血 合 肉	普 通 肉	普 通 肉
10	—	—	—	—
20	—	—	—	—
30	—	—	—	—
40	—	—	—	+
50	—	—	±	+
60	—	—	+	+
70	+	+	+	+
80	+	+	+	+
90	+	+	+	+
100	+	+	+	+
HgCl ₂ 沈 澱 反 応	—	—	+	+
揮 発 性 塩 基 窒 素	19.4	—	49.7	54.0
pH	5.8~6.0	5.8	6.0~6.2	6.2
室 温 °C	19		20	21

上記と同様な実験を防腐区を加えて行つた結果は第49表の如くである。東京魚市場購入のクロマグロ肉の血合肉を除いた部分を各 50g 大型試験管に容れ、上記と同様に放置し、一方はトルオール、クロロフォルムを加えて防腐区とし前記同様にアルコール中に於ける凝固の出現を観察した。

第49表 マグロ肉の鮮度低下と水浸出液中の蛋白凝固に要するアルコール濃度

放 置 日 数	0	1		2		3		4	
アルコール濃度%		A	B	A	B	A	B	A	B
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20	—	—	—	—	—	—	—	—	—
30	—	—	—	+	—	±	—	+	—
40	—	+	—	+	—	+	—	+	—
50	—	+	—	+	—	+	—	+	—
60	—	+	—	+	+	+	—	+	—
70	—	+	±	+	+	+	+	+	+
80	+	+	+	+	+	+	+	+	+
90	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HgCl ₂ 沈 澱 反 応	—	+	—	+	—	+	—	+	—
水 溶 性 全 窒 素		1453	1210	1489	1152	1816	1271	—	—
室 温 °C	22	20		21		23		23	

備 考 : Aは腐敗区, Bはトルオール, クロロフォルムによる防腐区水溶性全窒素はmg/100gで示す

第49表の結果からも、新鮮時には80%アルコールにて凝固を示したものが、20°C前後48時間経過後に30%で凝固に充分であることが見られる。又興味のある事実はトルオール及クロロフォルムで防腐処理を行つた区では、24時間後に稍々低濃度の60~70%で凝固するようになるが、それ以後96時間でもその濃度が維持せられて、腐敗放置区の如く低下しないといふことである。普通防腐条件下では自家消化的变化は進み得る筈であるが、その程度の分解ではアルコールによる脱水凝固の効果が現れ難いとする極めて興味ある現象だと思ふ。即ちその程度の分解では水和性に大きな変化を與えない訳である。

B) 魚肉水浸出液に無水アルコールを滴下した場合の濁濁並に沈澱の出現

以上で新鮮時と鮮度低下時に於ける水溶性蛋白質に安定性の相違のあることを知り得たがなお上記の実験結果を確かめる意味で魚肉水浸出液を一定量採取し、これに無水アルコールを滴下しつゝ濁濁並に沈澱出現を観察、その際の所要アルコール量を讀む一種の滴定方式を試みた。この実験で濁濁と呼ぶのは液が螢光を帶び、極めて薄い乳濁を呈し、アルコール滴下を中止したのちもかなり長い時間(24時間位)その状態を維持するような場合を指し、沈澱形成とはそれ以後にアルコール滴下を続けて、凝固が起り、液と凝固物とが分離する状態を意味する。また滴定の際注意を要する点はアルコールの滴下速度であつて滴下を緩徐に行うと、同一試料について、より少量のアルコールで濁濁及び沈澱が起り易いことである。それは恐らく蛋白よりの脱水が瞬間的には行われないためであらう。著者はこの場合滴下速度をアルコール1.0ccを約30秒で落すことに一定した。

試料は東京魚市場購入のカツヲを用い、普通肉部を50g宛大型試験管に入れ、室温放置して一定時間毎に細碎肉10.0gを100cc蒸留水で浸出し、1時間浸出後その濾液を1.0cc容ビーカーに採り、25ccビュレットより無水アルコールを滴下した。

第50表 カツヲ肉の鮮度低下と水浸出液中の蛋白凝固に要するアルコール量

放 置 日 数	0	1	2
濁濁形成に要したアルコール cc	1.8	0.6	0.3~0.4
同 上 アル コ ー ル 濃 度 %	64.0	38.0	23.0~28.5
沈澱形成に要したアルコール cc	3.0~3.2	2.6~2.7	0.8~0.95
同 上 アル コ ー ル 濃 度 %	75.0~76.1	72.2~72.9	44.4~48.7
浸出液100cc中の揮発性塩基窒素mg	3.8	4.5	11.3
浸 出 液 pH	5.4	5.4	6.0
室 温 °C	22	19	20

第50表の結果からも第49表から得られたと同程度のアルコール濃度で凝固が起つている

ことが知られる。即ち新鮮時には75~76%，鮮度低下時には44~49%と云う値が得られる。又この方法では沈澱以前の濁濁形成時の濃度も知ることが出来、その値の比較でより細かな検討が可能のようである。上例では0時と1日後の沈澱形成に要する濃度の差は僅か3%前後であるが、濁濁形成に要するアルコール濃度の差は26%程あり明かに水和力の差を判別することが出来る。

2) 魚肉水浸出液中に HgCl_2 が共存する場合のアルコールによる水溶性蛋白質の凝固

新鮮魚肉の水浸出液は HgCl_2 の濃度如何に拘らず蛋白質の凝固沈澱を生じ難いのであるがそれは蛋白質分子表面に HgCl_2 と結合し易き活性基が少いか或はまた結合し得る基があつても、蛋白質自身の充分な水和性に阻まれて沈降を妨げているかのいずれかであろう。仮に若干でも結合し得る基があるとすれば、 HgCl_2 共存の場合はこれが存在しない場合に比較してより少量のアルコール量で凝固を生ずるものと考えられる。

第50表に掲げた実験に使用した同じカツヲ肉の同じ水浸出液に就てその1.0ccに0.05 M HgCl_2 1.0ccを加え、アルコール滴下法による蛋白凝固に要するアルコール濃度を測定した結果は第51表の如くである。

第51表 HgCl_2 共存の場合の水溶性蛋白凝固に要するアルコール量

放 置 日 数	0	1	2
濁濁形成に要するアルコール cc	0.50~0.55	0.45	—
同上アルコール濃度 %	20~21.5	18.3	—
沈澱形成に要するアルコール cc	1.70~2.30	1.0~1.5	—
同上アルコール濃度 %	43.2~53.5	33.3~42.8	—
昇 汞 沈 澱 反 応	—	—	+

この結果は、予期したように HgCl_2 存在の場合は同一試料を扱つて、より低濃度のアルコールで濁濁並に沈澱形成が行われることが明かである。即ち第47表との比較に於て、濁濁形成で40%，沈澱形成で20~30%の相違が認められる。昇汞との沈澱形成を阻むものが蛋白分子を圍繞する水和層であることが充分推定出来ると思う。茲で極めて興味ある事實は昇汞沈澱反応が出現するような魚肉水浸出液での、アルコールによる蛋白凝固の際のアルコール濃度が44~49%で、新鮮肉水浸出液に HgCl_2 を共存せしめた場合の同上所要濃度が43~53%で略々一致すると云う事である。これは恐らくアルコール濃度によつて代表さ

れる水和力が、40・50%にまで低下した蛋白では共に HgCl_2 との沈澱形成が可能であることを示すものと考えられる。

殊に魚肉の鮮度低下が進行した場合でも、第45～47表等の実験結果から、水溶性蛋白凝固に要する最低濃度が30・40%以下にはならないことから見ても、 HgCl_2 が反応可能な蛋白質の持つ水和力がこの程度のアルコール濃度によつて示されるように考えられる。

次に上の第48表と同じ浸出液を使つて、予めアルコールを濁濁を生じない程度に加え置き、あとから0.05M HgCl_2 を加えた実験結果は第52表である。即ちアルコールで水和性を奪われた蛋白がより沈澱し易い事実を判定せんとするものである。

第52表 アルコールを予め加えた魚肉水浸出液に HgCl_2 を加えて濁濁及沈澱の形成

放 置 日 数	0	1 *
浸出液 1.0cc + 無水アルコール 1.0cc (50%) 混合液に0.05M HgCl_2 を滴下して濁濁形成cc	0.2	0.2
同 上 沈 澱 形 成 cc	1.6	2.0で沈澱形成せず
浸出液 1.0cc + 無水アルコール 0.5cc (33%) 混合液に0.05M HgCl_2 を滴下して濁濁形成	0.58	—
同 上 沈 澱 形 成 cc	3.6で沈澱形成せず	—

* この実験では浸出液1.0cc + 無水アルコール 0.4ccの混合液を用いた。鮮度低下のため0.6ccアルコールで濁濁を形成するからである。

第52表の実験でアルコール使用量を一定にしているために、0.05M HgCl_2 を加えてゆくことによつて、アルコールを稀釋してゆくことになり、場合によつては沈澱を形成せず濁濁状態のまゝ了することもあり、従つて HgCl_2 の所要量で水和の程度を判定することは困難であるが、表からも明かなように、同一の新鮮時の水浸出液で、アルコールの添加量の少い混液が、同一量の HgCl_2 では混濁を示さないことだけは確実である。即ち50%アルコール含有の場合の0.2ccでは33%アルコール含有の場合に效果なく(0.58ccを要している)溶液状態を維持している訳である。

以上のような実験結果から魚肉水溶性蛋白質と HgCl_2 の沈澱機構の中に蛋白分子の水和力が影響しているであろうことは一応推定が可能であると思われる。

A) アルコールによる凝固蛋白質の水への再溶性

以上の如き実験の場合、アルコールを加えることによつて蛋白質の変性を生じ、変性の結果として HgCl_2 に結合し易き基の活性化が考え得るのであるが、アルコール脱水によつて凝固した蛋白を迅速にアルコールを除いて、直ちに水を加えれば水中に再溶せしめることが出来る。

即ち、魚肉浸出液を少量時計皿に採り、無水アルコールを加えて、凝固せしめ、直ちに、毛細管ピペットでアルコールを除去、凝固物に蒸留水を加えると再溶する現象が見られる。

この水溶液に再びアルコールを加える時はその所要量が当初と大差ない値が得られるので、変性が起つたとしても、水和性の復歸出来る程度ではないかと考えられる。但しこの場合アルコールを加えて凝固が見出されてから3分以上経過するときは再溶は極めて困難となる。

B) 魚肉水浸出液中に HgCl_2 が共存する場合のアルコールによる凝固蛋白窒素量の定量

上記の如く新鮮魚肉の水浸出液中の蛋白質は充分水和性を保持しつゝ溶存し、その故に HgCl_2 との沈澱形成が行われ難いことが推定出来るが、 HgCl_2 共存の場合のアルコールによる凝固窒素量が蛋白窒素中のどの程度の量を占めるかを知るために、新鮮な試料の水浸出液を用いてこの中の蛋白態窒素、アルコール凝固物中窒素、 HgCl_2 量を変えた場合のアルコール添加後の凝固物中の窒素量を測定しその比較を行うこととした。

i) カツヲ肉の場合

東京魚市場より購入のカツヲを用い10.0g: 100ccの普通肉部の水浸出液を作製し、各10cc中の上記諸形態の窒素量を測定した。即ちアルコール凝固窒素は10.0ccに無水アルコール22ccを加え、凝固沈澱せしめたものに就き、 HgCl_2 共存の場合は10.0ccに1.0ccの0.05 MHgCl_2 を加え、のち20ccの無水アルコールを加え凝固沈澱せしめたもの並に10.0ccに0.05 MHgCl_2 10ccを加え、のち10ccの無水アルコールを加え凝固沈澱せしめたものに就き、夫々キエルダール法で測定を行つた。

第53表 カツヲ肉水浸出液中の HgCl_2 共存の場合のアルコール凝固窒素量(mg/100g)

水 溶 性 全 窒 素	1288
三塩化醋酸による蛋白態窒素	706
ア ル コ ー ル 凝 固 窒 素	661
HgCl_2 共存アルコール凝固窒素*	784
同 上 **	827

* 0.05 MHgCl_2 1.0cc+アルコール 20cc

** 0.05 MHgCl_2 1.0cc+アルコール 10cc

この試料は全窒素4.25%, 揮発性塩基窒素30mg/100gで良好な鮮度ではなかつたが、昇沈澱反応は認められなかつたものである。この表でアルコール凝固窒素量は最も少いが、蛋白態窒素量の大部分を占めていると云い得るから、上記の諸実験で、アルコールによる脱水の対象となつた蛋白質は一応その大半が反応に参加したものと見做して差支えないものとする。アルコール単用の場合に比較して HgCl_2 共存の場合は窒素量が多いのは、アルコールで固定し得ずして HgCl_2 で沈澱せしめられるものの存在を意味すると同時に、添加量に応じて窒素量が増加していることは後述する (X項) ように蛋白質と昇汞との定量的結合を示す一例であると云える。

ii) ビンナガマグロ肉の場合

東京魚市場より購入のビンナガマグロ普通肉を用い、前項と同一方法で各種形態の窒素量を測定した結果は第51表の如くである。この試料は鮮度良好で揮発性塩基窒素22mg/100gであつた、この場合アルコール凝固窒素は浸出濾液10.0ccに無水アルコール30cc, HgCl_2 共存の場合は0.05M HgCl_2 1.0cc とアルコール20cc並に10.0ccと7.0ccの2種を行つた。

第54表 ビンナガマグロ肉水浸出液中の HgCl_2 共存の場合のアルコール凝固窒素量 (mg/100g)

水 溶 性 全 窒 素	1411
三塩化醋酸による蛋白態窒素	949
アルコール凝固窒素	874
HgCl_2 共存アルコール凝固窒素*	906
同上**	992

* 0.05 M HgCl_2 1.0cc + アルコール 20cc

** 0.05 M HgCl_2 10cc + アルコール 7 cc

第54表の結果からも、カツプの場合と同様な事実が認められる。即ちアルコール凝固窒素が蛋白窒素の大部分を占めると云ふこと、 HgCl_2 の添加量の増加に伴つて、沈澱窒素量も増大すると云ふことである。

C) 魚肉水浸出液中に HgCl_2 が共存する場合のアルコールによる凝固蛋白窒素量の変化と腐敗経過

前項の如く新鮮魚肉で認められたことが、腐敗過程にも存在し得るかを確かめるために、東京魚市場より購入の新鮮カツヲ肉を用い、上記の諸形態の窒素量を腐敗の進行を追うて定量することとした。試料は2.1kgの魚体から普通肉部のみをとり、各50.0gを大型試験管に収めて室温に放置し、経過時間毎にこれを細碎して、その100gを100cc蒸留水で浸出し濾液中の窒素分布をしらべた。

第55表 カツヲ肉の腐敗過程に於ける水浸出濾液中の HgCl_2 共存の場合のアルコール凝固窒素量の変化 (mg/100g)

放 置 日 数	0	1	2
水 溶 性 全 窒 素	1812	1746	—
三塩化醋酸による蛋白態窒素	868	442	631
ア ル コ ー ル 凝 固 窒 素 *	681	409	661
HgCl_2 共存アルコール凝固窒素**	579	559	592
同 上 ***	818	739	868
揮 発 性 塩 基 窒 素	8.1	36.3	64.8
室 温 $^{\circ}\text{C}$	28	27.5	31.0

- * 水浸出濾液10.0cc + 無水アルコール 30cc
- ** 同 上 10.0cc + 0.05 MHgCl_2 1.0cc + 無水アルコール 30cc
- *** 同 上 10.0cc + 0.05 MHgCl_2 5.0cc + 無水アルコール 30cc

第55表の実験では1日後に昇汞沈澱反応が陽性を示したのであるが、表から明かなように、蛋白態窒素の増減に応じて、アルコール凝固窒素、 HgCl_2 沈澱窒素量の増減が見られ HgCl_2 共存の場合のアルコール凝固窒素は、添加した HgCl_2 の量によつて増加することも認められる。更に重要なことは、そのような傾向が新鮮時に於ても、腐敗時に於ても、略々同様であ点である。これは蛋白質と HgCl_2 との結合が新鮮時腐敗時を通じて、本質的に大差のないことを暗示するものではないかと思われる (X 項) たゞアルコール単用の場合は新鮮時の方が三塩化醋酸で落される蛋白窒素量より少いにも拘らず、腐敗時には略々近い値を示す点が注意される。

D) 魚肉水溶性蛋白質の電荷の影響を検定する一つの試み

HgCl_2 が共存する場合、より少量のアルコールで魚肉水溶性蛋白の凝固が完結することとはどのような機構によるかは重要な問題であると思う。親水性膠質の水中に於ける安定性は溶質である高分子の持つ電荷と水和性によつて支えられていると解釋されている。上記

までの実験結果で、魚肉の水浸出液中の水溶性蛋白質が、 HgCl_2 中の Hg イオンで放電せられ、電荷によつて支えられている安定性の部分は失われ、残余の水和力にのみによつて維持せられているために、よりアルコール量の少い濃度で凝固するのであるかどうか吟味を要す可きであらう。腐敗魚肉で生ずる HgCl_2 沈澱は、その水溶液の pH 調節だけでは消失せず、沈澱現象が單なる金属イオンと水溶性蛋白質との間の反対イオンの結合と云うことでは説明が困難であることは既に述べたところである。

従つて HgCl_2 共存の場合のアルコールによる凝固に於ても、蛋白質と HgCl_2 との一種の配位化合物的な生成体を生じ、そのものゝ持つ水和性が、水溶性蛋白及び HgCl_2 の持つ水和性よりも劣ると云う考え方も可能な訳である。

前のような場合に就ては例えば Kruyt⁸⁷⁾ らが寒天ゾルの親水性を説明するために、水和力と電荷の区分を、脱水劑と電解質とを併用して、明らかにしている。それによれば、脱水劑（アルコール、アセトン、タンニン等）で処理した寒天ゾルは電解質で容易に沈澱し、電解質で電荷を消失せしめたそのものは、脱水劑でたやすく沈澱することを証明して寒天ゾルの親水性のうち水和力と電荷との区分を分別した訳である。

HgCl_2 による沈澱が若しこのように説明出来るとすれば、アルコール脱水の行われた蛋白質が凝固する際、当然同價の他のイオンにも同じ現象が起らねばならず、更には多價の例えば 3 價イオン共存の場合は、より少量のアルコールで沈澱を生じなければならないと考える。即ち價数の異なる反対イオンの同一濃度の液が水溶性蛋白の凝固を起すに必要な量をアルコール所在の場合にしらべることによつて、 HgCl_2 の沈澱が單に反対イオンによる分子電荷の放電に基くものかどうかを推定出来る筈であらう。

東京魚市場より購入した新鮮なクロマグロの普通肉部を用い、10g: 100cc の水浸出液を作製し、その濾液 1.0cc に 0.05M の HgCl_2 , BaCl_2 , MgCl_2 , AlCl_3 , NaCl (NaCl の場合は 5M, 0.5M をも含む) 各 1.0cc を加えたのち、既述の如く、無水アルコールをビュurette より滴下して潤濁並に沈澱の出現時のアルコール量を測定した。

第56表 HgCl_2 以外の 2 價及 3 價塩類共存の場合のアルコールによる水溶性蛋白質の凝固

放置日数	0		1		2		3		4	
混濁(A)沈澱(B)	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
塩無添加浸出液	2.2	4.0	1.5	2.5	2.2	3.3	2.2	3.5	1.8	2.3
5M NaCl	0.5	0.7	0.4	0.8	0.5	0.6	0.5	0.6	—	—
0.5M NaCl	—	—	0.4	0.5	—	—	—	—	—	—
0.05M NaCl	2.2	4.0	0.8	1.1	—	—	—	—	—	—
0.05M MgCl ₂	* opal (10.0)	(20.0)	opal (7.0)	(20.0)	opal (6.7)	(20.0)	opal (10.0)	-(20.0)	opal (5.0)	-(20.0)
0.05M BaCl ₂	* opal (10.0)	(20.0)	opal (2.6)	-(20.0)	opal (5.0)	-(20.0)	opal (1.4)	-(20.0)	opal (2.0)	-(20.0)
0.05M AlCl ₃	-(10.0)	—	-(10.0)	—	-(10.0)	—	-(10.0)	—	-(10.0)	—
0.05M HgCl ₂	2.0	3.5	1.8	2.2	2.0	2.6	2.0	2.5	1.0	1.5
0.05M AgNO ₃	—	—	—	—	—	—	0.8	-(10.0)	1.1	-(10.0)
0.05M CuSO ₄	—	—	—	—	—	—	0.2	0.8	0.3	0.5
揮発性塩基窒素	9.3		22.2		18.9		20.6		25.8	
昇汞沈澱反応	—		—		—		—		—	
pH	5.4		5.6		5.6		5.6		5.6	
室温 °C	22		20		20		20		20	

* opal は全液が薄い螢光を帯びた乳白色を呈した場合を示す。基しい混濁ではない。

第56表はその実験結果であるが、若し沈澱さる可き蛋白質が負に帯電しているとすれば当然3價の Al⁺⁺⁺を加えた場合は、他の2價のイオンの場合より、微少の量で凝固せねばならないのに、事實は之に反し AlCl₃共存の場合は全く混濁すら起らない。凝結の効果と價数との関係は例えば As₂S₃、ゾルの場合は3價イオンは2價イオンの約1/10量、1價イオンの約1/500量で、凝固現象に利用して来るから上記のように、却つて凝固が妨げられるような事は考え得られない訳であるし、Hgと同じ2價イオンのMg⁺⁺ Ba⁺⁺等がHgCl₂の場合と異なる行動をとることも説明が困難である。

上表の場合は放置温度が20°Cであつたためと、魚肉自身に脂肪が多かつたため、腐敗がよく進行しなかつたので、東京築地の自由市場より購入した他のクロマグロ肉を、32°Cの恒温器中に放置して上記と同様実験を反覆した結果は第57表の如くである。

第57表 HgCl₂ 以外の2價及3價塩類共存の場合のアルコールによるクロマグロ肉水溶性蛋白質の凝固

放置時間	0		24	
混濁(A)沈澱(B)	A	B	A	B
塩類無添加浸出液	1.8	3.0	1.0	2.5
5.0M NaCl	1.0	1.6	0.8	1.1
0.5M NaCl	1.2	1.4	1.9	3.5

0.05M NaCl	3.2	5.7	2.8	8.0
0.05M MgCl ₂	3.5	10.0 *	5.0	10.0 *
0.05M BaCl ₂	1.2	5.0 *	0.75	5.0 *
0.05M HgCl ₂		0.7		0.45
0.05M AlCl ₃	-(10.0)		-(10.0)	
0.005M AlCl ₃	-(10.0)		-(10.0)	
0.05M AgNO ₃	0.3	-(10.0)	0.5	-(10.0)
0.05M CuSO ₄	0.2	0.3	—	0.4
揮 発 性 塩 基 窒 素	16.9		24.9	
pH	5.6		5.6	

* BaCl₂, MgCl₂ の場合は放置後約20分で凝固を示した。

又南氷洋産冷凍ナガス鯨赤肉を用い、10g:100ccの水浸出液を作製し、その1.0ccに0.05Mの上記各塩類溶液1.0ccを加え、次でアルコールで凝固の生ずるまで滴定を行つた値は第55表に示す通りである。

第58表 HgCl₂以外の2價及3價塩類共存の場合のアルコールによるナガスクヂラ肉水溶性蛋白質の凝固

	濁 濁 形 成	沈 澱 形 成
5.0 M NaCl	7.0	11.0
0.05M MgCl ₂	2.0	10.0 *
0.05M BaCl ₂	1.7	-(20.0)
0.05M HgCl ₂	—	0.2
0.05M AlCl ₃	-(20.0)	—
塩 類 無 添 加 浸 出 液	1.1	2.0
揮 発 性 塩 基 窒 素	25	
pH	5.8~6.0	

* アルコール10.0cc添加後約15分~20分で凝固を示した。

この表からもマグロ肉で得られた結果と同様な傾向を見ることが出来る。即ち同價の他のイオンと、HgCl₂の場合の現象とは明かに相違しているのである。仮りに第56表のマグロ肉の場合、鮮度低下が著しくないのので、水溶性蛋白質が正に帯電しているとして、塩類中の陰イオンの効果が考えられるとしても、BaCl₂ MgCl₂等で凝固を示さない事実を説明することが出来ない。又1價のNaClだけが凝固する事実も説明困難である。

勿論、このような凝固現象に於て、原子價の影響以外に、吸着され易いイオンがより有効な凝固効果を與える訳であるから、その影響も考えねばならない。陽イオンの固体表面^{84, 85)}に於ける被吸着能はよく知られているように、H⁺ > Ag⁺ > Hg²⁺ > Al³⁺ > Zn²⁺ > Mn²⁺ >

$\text{Ca}^{++} > \text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$ の順序に弱くなる。若しこの点で影響を受けるとすると、 Hg^{++} を挟んで Ag^+ と Al^{+++} とが問題になるが表からも明かなように、 AgNO_3 の場合は濁濁は認められるが、沈澱を生ぜず、 AlCl_3 の場合は全く濁濁をも形成しないので、この系列からの説明も困難と考える。従つて既に第Ⅷの項に於て、昇汞蛋白沈澱物中の Hg^{++} 並に Cl^- の定量結果にも示されるように、 HgCl_2 としての沈澱形成即ち一種の配位化合物的形成を想定することが最も妥当のように信ぜられる。即ち配位化合物形成の難易が本沈澱生起の有無を決すると考えられるのである。

3) 魚肉水溶性蛋白質の安定性に及ぼすその他の要因

腐敗魚肉の場合、その浸出液中の水溶性蛋白質が新鮮時のそれに比して、より低濃度のアルコールで凝固する事実は既述の通りであるが、新鮮肉を稀薄食塩水又は稀薄アルカリで抽出した場合はどうであるかに就ても、これら抽出液の HgCl_2 に対する反応性から顧みて重要な点であると思う。

A) 魚肉の NaCl抽出液中の蛋白質の安定性

Kahlbaum 製 NaCl を用い、この 1.0%液を作製、これより、稀釋を行つて 0.1%, 0.05%, 0.01%液各 100cc を作製し、クロマグロ肉 10.0g を夫々抽出、1 時間後に濾過を行つてその 1.0cc に就て、既述のビューレットよりアルコールを滴下する方法によつて、濁濁並に沈澱の出現を観察した。試料マグロ肉は揮発性塩基窒素 16.9mg/100g の鮮度良好のものである。

第59表 クロマグロ肉の稀薄食塩水抽出液中の水溶性蛋白質のアルコールによる凝固

抽出用 NaCl 液 濃度 %	0	0.01	0.02	0.05	0.1
混濁形成時のアルコール量cc	1.1	1.1	0.9	0.8	0.8
同上 アルコール濃度 %	52.4	52.4	47.3	44.4	44.4
沈澱形成時のアルコール量cc	2.1	2.3	2.1	1.8	1.6
同上 アルコール濃度 %	67.7	69.6	67.7	64.2	61.5
浸 出 液 pH	6.17	6.17	6.17	6.08	6.10

第 59 表の結果から微量の NaCl 共存の場合の魚肉浸出液に於ても、その NaCl の増量に依じて、アルコールに対する安定性が低下する事実が認められる。

B) 魚肉の稀薄アルカリ抽出液中の蛋白質の安定性

正確に標定した $\frac{N}{10}$ NaOH 1.0~11.0cc を夫々稀釋して 100cc となし、この稀薄苛性ソーダ液を用いて、マグロ肉を試料としてその 10.0g を所定の如く、1 時間浸出し、その濾液

1.0cc に就てアルコールによる滴定を行つた。第60表はクロマグロ、第61表はピンナガマグロ肉による同様な実験結果である。pH 測定はいずれもアンチモン電極法による。

第60表 ピンナガマグロ肉の稀薄アルカリ抽出液中の水溶性蛋白質のアルコールによる凝固

100cc 中に含まれる 0.1N NaOH 量 cc	0.	1.0	3.0	5.0	7.0	9.0	11.0
混濁形成時のアルコール量 cc	0.8	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8
同 アル コ ー ル 濃 度 %	44.4	50.0	47.3	47.3	47.3	47.3	44.4
沈澱形成時のアルコール量 cc	2.6	2.3	1.6	1.6	1.2	1.2	1.0
同 アル コ ー ル 濃 度 %	72.2	69.6	61.5	61.5	54.5	54.5	50.0
浸 出 液 pH	5.57	5.71	6.10	6.37	6.64	6.87	6.90

第61表 ピンナガマグロ肉の稀薄アルカリ抽出液中の水溶性蛋白質のアルコールによる凝固

100cc中に含まれる 0.1N NaOH 量 cc	0	1.0	3.0	5.0	7.0	9.0
混濁形成時のアルコール量 cc	1.2	1.2	1.1	1.0	0.9	0.7
同 アル コ ー ル 濃 度 %	54.5	54.5	52.4	50.0	47.3	41.2
沈澱形成時のアルコール量 cc	2.4	2.3	2.0	1.7	1.7	1.2
同 アル コ ー ル 濃 度 %	70.6	69.6	66.6	62.9	62.9	54.5
浸 出 液 pH	5.95	6.05	6.30	6.66	6.80	6.99

これらの結果からも、稀薄アルカリの濃度増加と共に、安定性の低下している事実が明らかにみとめられる。但しその低下の程度が腐敗魚肉の水浸出液の場合ほど甚しくないのはこの程度のアルカリでは、蛋白分子の分解がそれ程大きくないことによるものと思われる。又これらの抽出法によれば、所謂、肉中のミオシン系の蛋白質がより多く抽出されることになるから、純粋な水浸出液中の蛋白質とも、質的に相違すると云う点も考慮すべきであろう。

C) 魚肉の尿素抽出液中の蛋白質の安定性

蛋白質の変性剤としての尿素を用いて、ピンナガマグロ肉を抽出した液に就て行つたアルコールによる滴定結果をのべる。試料は第58表に用いたと同じ肉を用い、0.1モル、0.5モル、1.0モル、5.0モルの尿素液100ccを用い、1時間浸出後、その濾液1.0ccを採り、アルコール滴定による混濁並に沈澱形成をしらべた。

第 62 表 ピンナガマグロ肉の尿素液による抽出液中の可溶性蛋白質のアルコールによる凝固

尿 素 モ ル 濃 度	0	0.1	0.5	1.0	5.0
混濁形成時のアルコール量 cc	1.2	1.6	1.4	0.9	—
同 アル コ ー ル 濃 度 %	54.5	61.5	58.3	47.4	—
沈澱形成時のアルコール量 cc	2.4	2.6	2.3	2.3	0.1
同 アル コ ー ル 濃 度	70.6	72.2	69.6	69.6	9.9
浸 出 液 pH	5.95	5.96	6.00	6.08	6.61

この結果によると、0.1~1.0 モル程度の尿素液浸出では、純水抽出液の場合と大差ないが、5.0 モルに至つて、顯著に凝固が見られ、極く少量のアルコールで沈澱形成をすることがわかる。アルブミン等に対する尿素変性の効果と、尿素濃度との関係でも、尿素5~10モルに至らないと、SH 基の出現が認められないと云う研究等^{90,91)}もあるので、上記の実験に於て、低濃度の尿素液浸出では、純水抽出と大差のない結果を示したことも、一応当然と考えられるのではないかとおもう。たゞこの実験では尿素共存のまゝ、アルコール滴定を行つてゐるから、高濃度尿素液中で、蛋白質が凝固し易いと云う事実があれば、必ずしも、茲に述べたような推定は当らない訳である。

以上の諸実験によつて、魚肉の稀薄中性塩浸出液、稀薄アルカリ浸出液中の蛋白質の水和性が低下する事実、並に純水可溶性蛋白質の尿素処理による水和性の低下が認められる。

IX 魚肉水溶性蛋白質中の活性基と HgCl_2 の結合可能性

上述の諸実験から、魚肉水溶性蛋白質と HgCl_2 との沈澱現象は、 Hg^{++} イオンの結合と云うよりは、むしろ HgCl_2 の蛋白質との配位化合物的結合が、妥当であると考えられる点が多いように思う。この場合 HgCl_2 を迎える活性基は単一では恐らくなく、種々の基⁹²⁾があげられる。

例えばペプチド結合が腐敗によつて切れた場合に生ずるアミノ基、リジンの γ アミノ基、アルギニンのグアニジン基、ヒスチジンのイミダゾール基、システインのスルフヒドリル基等が考えられると思う。

蛋白質を構成する場合、 α 位のアミノ基は他のアミノ酸のカルボキシル基とペプチド結合形成をするから、この部分が活性に反応することはないであらう。又上述の基にしても、天然蛋白質では反応が陽性に出る機会は、分析の結果のアミノ酸組成より期待される場合より、遙かに少いか又は反応しない例すら知られているから、反応性を増すためには変性

若くは腐敗分解等が、必須の前提になると考えられる。新鮮魚肉の水浸出液中の蛋白質が HgCl_2 によつて、沈澱せしめられない理由の一には、これらの基が活性化していないか又は親水性基では之が固く水をひきつけているために由るものであらう。

そこで、これらの基が HgCl_2 との結合をなす主体であらうとを推定するために、昇汞沈澱反応が生ずるようになった魚肉水浸出液をフォルマリン、沃度醋酸等で、処理したのちに HgCl_2 を加えその沈澱形成の有無を検定することにした。

1) 魚肉水浸出液のフォルマリン処理と昇汞沈澱の消失

フォルマリン⁹³⁾ 処理を行つた魚肉水浸出液の昇汞沈澱形成の有無を定性的に検定するために $20\sim 23^\circ\text{C}$ の室温で、腐敗に至らしめたクロマグロ肉 (このまゝ揮発性塩基窒素 $54\text{mg}/100\text{g}$) の $10\text{g}:100\text{cc}$ 水浸出濾液各 1.0cc を用いて、 HCHO 添加の効果をしらべてみた。

第63表 鮮度低下クロマグロ肉水浸出液のフォルマリン処理と昇汞沈澱の消失

浸出液使用量 cc	Formalin 使用量	0.05MHgCl_2 量	HgCl_2 沈澱の有無
1.0	1.0	1.0	—
1.0	0.1	1.0	+
1.0	0	1.0	+

結果は第63表の如くで、フォルマリン量 (35%) が充分多ければ、処理後に HgCl_2 を加えても沈澱の形成せられないことはわかつた。よつて、鮮度の低下してゆく魚肉を逐日、しらべて、フォルマリン共存の場合の HgCl_2 による沈澱の有無を検討した。

試料は鮮度良好なマサバを使用し、これを 25°C に放置し、腐敗経過とフォルマリン処理の効果とをみた。フォルマリンは局方フォルマリン (約35%) を用い、 0.1N NaOH で中和したのち使用した。濃度は約3.5%から約30%までを5階級に稀釋し、魚肉浸出液 1.0cc に対して 1.0cc を加え、沈澱の有無と pH をしらべ、次に $0.05\text{MHgCl}_2 1.0\text{cc}$ を加え、同じく pH と沈澱の有無を検した。

第 64 表 サバ肉の腐敗経過とその水浸出液のフォルマリン処理による昇汞沈澱の消失

第 1 日 揮発性塩基窒素 $19.4\text{mg}/100\text{g}$

魚肉浸出液量	Formalin 量 1.0cc		Formalin 添加後沈澱形成の有無	Formalin 添加後の pH	$0.05\text{M HgCl}_2 1.0\text{cc}$ 添加後沈澱の有無	HgCl_2 添加後の pH
	蒸溜水量	35% Formalin 量				
1.0	0.9	0.1	—	5.4	—	5.4
1.0	0.7	0.3	—	5.4	—	5.4
1.0	0.5	0.5	—	5.4	—	5.4
1.0	0.3	0.7	—	5.4	—	5.4

1.0	0.1	0.9	—	5.4	—	5.4
1.0	1.0	0	—	5.8	微かに混濁	5.4

第2日 揮発性塩基窒素 49.7mg/100g

魚肉浸出液 量	Formalin 量 1.0cc		Formalin 添加後沈澱形成の有無	Formalin 添加後の pH	0.05M HgCl ₂ 1.0cc 添加後沈澱の有無	HgCl ₂ 添加後の pH
	蒸溜水量	35% Formalin 量				
1.0	0.9	0.1	—	5.4	+	5.4
1.0	0.7	0.3	—	5.4	—	5.4
1.0	0.5	0.5	—	5.4	—	5.4
1.0	0.3	0.7	—	5.4	—	5.4
1.0	0.1	0.9	—	5.4	—	5.4
1.0	1.0	0	—	6.4~6.6	+	5.4

第3日 揮発性塩基窒素 54.0mg/100g

魚肉浸出液量	Formalin 量 1.0cc		Formalin 添加後沈澱形成の有無	Formalin 添加後の pH	0.05MHgCl ₂ 1.0cc 添加後沈澱の有無	HgCl ₂ 添加後の pH
	蒸溜水量	35% Formalin 量				
1.0	0.9	0.1	+	5.6	±	5.4
1.0	0.7	0.3	—	5.4	±	5.4
1.0	0.5	0.5	—	5.4	—	5.4
1.0	0.3	0.7	—	5.4	—	5.4
1.0	0.1	0.9	—	5.4	—	5.4
1.0	1.0	0	—	7.0	+	5.4

第64表の結果から、魚肉水浸出液とフォルマリンとの間の反応*は新鮮肉ではフォルマリンの濃度如何に拘らず、沈澱しないことがわかる。しかし或る程度腐敗に達した魚肉では浸出液とフォルマリンとの混合比によつては（添加フォルマリンの濃度によつては）著量の沈澱が見られる（第3日の欄参照）。換言すれば、フォルマリ濃度が低い場合は沈澱を生じ濃度が高い場合には、フォルマリンだけによる沈澱の生じないことがわかる。

魚肉水浸出液に加えられたフォルマリンが充分過剰である場合、フォルマリン単用の際生ずる沈澱が再溶する事実を確かめるために20~23°Cで放置腐敗せしめたクロマグロ肉（揮発性塩基窒素85mg/100g）を用い、この浸出液に濃度の異なるフォルマリンを加えた場合の沈澱の状況を観察した結果は第65表の如くである。

第65表 腐敗クロマグロ肉浸出液のフォルマリン添加による沈澱形成

* 最近、佐々木・藤巻両氏はフォルマリン反応による魚肉鮮度判定法を提案した。（雑誌研究所報告、1950）

魚肉浸 出液量	Formalin 量 1.0cc		Formalin 添加後沈澱 形成の有無	Formalin 添加後の PH	0.05M HgCl ₂ 添 加 量	0.05MHgCl ₂ 添加後の沈澱 形成の有無	HgCl ₂ 添 加 後 の pH
	蒸溜水量	35% For malin 量					
1.0	0.9	0.1	卅	5.4	1.0	+	5.4
1.0	0.7	0.3	卅	5.4	1.0	+	5.4
1.0	0.5	0.5	卅	5.4	1.0	+	5.4
1.0	0.3	0.7	+	5.4	1.0	+	5.4
1.0	0	1.0	—	5.4	1.0	—	5.4
1.0	1.0	0	—	7.0~7.2	1.0	+	5.4

備考：卅は沈澱粒子 1mm程度の凝塊を示す。

この結果から、鮮度低下の程度によつては、かなり高濃度のフォルマリンでも、沈澱形成を行う事実がみられるが、いずれにしても、過剰のフォルマリンに本沈澱が再溶することだけは確かであると思う。

又 HgCl₂ 単独の場合で沈澱を生ずるような場合、フォルマリンの適当量で処理すれば、その濾液中の HgCl₂ との沈澱は全く消失することはいずれの場合も共通である。従つて使用フォルマリン量が少い場合には、濾液中に含まれる各種遊離アミノ基その他の基及び蛋白質の活性基を充分封鎖することが出来ないために、残余の活性基はあとから加えられた、HgCl₂ と反応することになる訳である。

第64表の第2日の浸出液を用いて、少量のフォルマリン共存の場合の HgCl₂ 沈澱窒素量を測定した結果は第66表の如くである。

第66表 鮮度低下サバ肉浸出液をフォルマリン処理とした場合の HgCl₂ 沈澱窒素量

浸出液 使用量 cc	35% Formalin 添加量 cc	0.05MHgCl ₂ 添加量 cc	試料用 10g 中の全窒素量 mg
10.0	1.0	5.0	836
10.0	3.0	5.0	0
10.0	0	5.0	860
10.0	20%三塩化醋酸 1.0cc 添加	—	791
10.0	浸出液中全窒素	—	1223

第66表の場合、浸出液 10.0cc に対して約 35% フォルマリン 1.0cc では活性基の封鎖が完全に行われず、3.0cc に至つて完全に行われたと見るべきであろう。Formalin の添加量に伴い、HgCl₂ 沈澱の減少する割合は比濁測定によつて別項 (X, 7) に述べる。

2) 魚肉水浸出液のモノ沃度醋酸處理と昇汞沈澱の消失

A) モノ沃度醋酸のみの場合

^{93, 94)}モノ沃度醋酸が結合し得る活性基は、-SH 基、-NH₂ 基、<=>OH 基等があげられる。従つてモノ沃度醋酸による活性基封鎖が HgCl₂ 沈澱形成を阻むものとするれば、これらの基群の、HgCl₂ に対する反応も考慮せねばならないと考える。

南水洋産冷凍鯨肉を各10.0g宛、25°C恒温器中で腐敗せしめ、3日後揮発性塩基窒素57.5 mg/100gに達したものを、100ccの蒸留水にて浸出、その濾液1.0ccに就て、0.1Mモノ沃度醋酸処理を行つたのち、HgCl₂との沈澱形成の有無を検した結果は、第 67 表の如くである。

第67表 腐敗鯨肉水浸出液の沃度醋酸処理による HgCl₂沈澱の消失

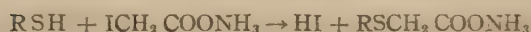
鯨肉浸出液量 cc	モノ沃度醋酸量		モノ沃度醋酸添加後の 沈澱有無	モノ沃度醋酸添加後の pH	0.05M HgCl ₂ 添加量 cc	0.05M HgCl ₂ 添加 後の沈澱形 成の有無	HgCl ₂ 添加後 の pH
	蒸留水量	0.1 M モノ 沃度醋酸量					
1.0	0.9	0.1	—	6.4	1.0	+	5.4
1.0	0.7	0.3	—	4.8	1.0	—	4.6
1.0	0.5	0.5	—	4.6	1.0	—	4.4
1.0	0.3	0.7	—	4.2	1.0	—	4.2
1.0	0	1.0	—	4.0	1.0	—	4.0

この結果によると、鯨肉の10倍水浸出液1.0ccに就て、0.1モルモノ沃度醋酸0.3ccで、充分 HgCl₂の沈澱を抑制することがわかり、沃度醋酸が封鎖可能な活性基も又、HgCl₂との反応性のあることを示すものである。

B) アンモニアを用いて、中和したモノ沃度醋酸処理

モノ沃度醋酸で処理を行つた魚肉浸出液では HgCl₂の沈澱は皆無であるが、モノ沃度醋酸を、アンモニアを用いて中和し、中性にした溶液を用いて処理した場合には、HgCl₂による沈澱が顯著に形成せられる。

中和は0.1Mモノ沃度醋酸に濃アンモニア液を滴加し、予めフェノールフタレインを指示薬として薄桃色に呈色した時のアンモニア量をよみ、他にフェノールフタレインを加えない試液に就て、同量のアンモニア量を加えたものを使用した。なおこの中和沃度醋酸は HgCl₂と反応を呈さない。中和せられたモノ沃度醋酸は恐らくCH₃COONH₃の形をとるであろうから、このものが蛋白質中のSH基、NH₂基と作用して



の如く反応するものと想像せられる。モノ沃度醋酸の場合に形成せられる化合物はRSC H₂-COOH, RNHCH₂COOHの如く末端がカルボキシル基であつてHgCl₂に対する活性は示さないが、上の場合であると、末端がなお HgCl₂との結合能力を有するから、沈澱形成が起る訳であろう。従つて魚肉浸出液を HgCl₂のみで沈澱せしめた場合と、アンモニア中和による沃度醋酸処理後に HgCl₂で沈澱せしめた場合の、沈澱物中の窒素量なり、水銀量を

測定することによつて、 HgCl_2 に親和性ある活性基の種類が判定出来るものとする。

試料はビンナガマグロ肉を用い、揮発性塩基窒素 24mg/100g に鮮度低下した肉の10倍水浸出液を用い、この 5.0cc に、アンモニア中和モノ沃度醋酸を 5.0cc 添加後 0.05M HgCl_2 5.0cc を加え、沈澱せしめたものと、この処理を行わず、 HgCl_2 のみで沈澱せしめたものを作製し、沈澱物中の窒素、濾液中の水銀の定量を行つた。

窒素定量は常法の如くであるが、水銀の定量は、濾液に直接 H_2S を通じて、硫化水銀として沈澱せしめたものを集め、水でよく洗滌し洗液中に塩素の反応の消失するに及んで、沈澱に水 10.0cc、N/10 沃度液 10.0cc 及び CS_2 約 2cc を加えて振盪しつゝ 1 時間放置後過剰の沃度を N/10 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ を以て滴定し、 Hg 量を算出した。

第68表 中和沃度醋酸処理と沈澱物中の窒素並に水銀量

処 理 方 法	5.0cc 中窒素量	濾液中残存 Hg mg	沈澱物中の Hg mg
浸出液 5.0cc 全窒素	6.62	—	—
浸出液 5.0cc + 中和モノ沃度醋酸 5.0cc + 0.5M HgCl_2 5.0cc	6.08	40.6	9.2
浸出液 5.0cc + 0.05M HgCl_2 5.0cc	6.08	38.5	11.3
浸出液 5.0cc + モノ沃度醋酸 5.0cc + 0.05 M HgCl_2 5.0cc	0	—	—

この場合沈澱窒素量は、中和沃度醋酸処理後 HgCl_2 を加えたものも HgCl_2 単用の場合も同じ値であるから、遊離のアムモニアにのみ HgCl_2 が結合したとは考えられず、やはり沃度醋酸部分に封鎖された部位に於て、末端のアムモニア基にあらためて HgCl_2 が結合し、蛋白全部を落したものと考えられる。従つて沃度醋酸の結合能力から考えて、少なくとも遊離のアミノ基は当然 HgCl_2 との反応性を有することが推定可能である。

3) 魚肉浸出液の尿素による處理と HgCl_2 沈澱形成の有無

A) 魚肉浸出液に尿素を溶解せしめた場合の HgCl_2 沈澱形成の有無

HgCl_2 の結合位置は単一ではないであらうが、SH 基の結合性を検討するために、魚肉水浸出液の尿素処理を行い、溶存する蛋白質中の SH 基の活性化を行い、これに HgCl_2 を添加した場合の沈澱形成の有無をしらべた。

尿素処理の方法は、魚肉10倍水浸出液 20cc に、夫々尿素を加えて終末濃度が 0.1, 0.5, 1.0, 5.0M となるようにし、この液を一定時間毎に SH 基の定量を行い、併せて HgCl_2 の反応を檢した。SH 基定量法は、モノ沃度醋酸による方法と、赤血塩による方法を併せ行つた。

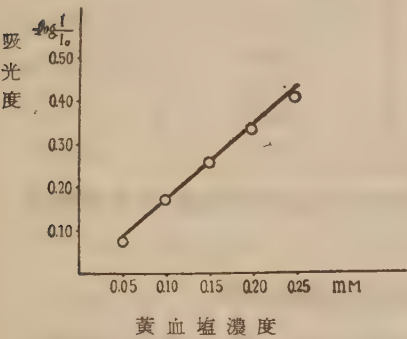
モノ沃度醋酸法³³⁾は、試料液 5.0cc に 0.1 モルモノ沃度醋酸 5.0cc を加え、20°C 恒溫器に 30

分放置、次に20%三塩化硫酸1.0ccを加え、除蛋白を行い、その濾液に10%及び過酸化水素液濃硫酸各0.1ccを滴加して、再び20°Cに1時間放置し、遊離沃度をN/1000チオ硫酸ソーダで滴定する。

赤血塩法³¹⁾は、試料液5.0ccに、0.05M赤血塩2.0ccを加え、磷酸緩衝液の所在に於てpH 6.8となし、20°Cに30分放置後、20%三塩化硫酸1.0ccを加え、除蛋白後濾液を、そのまゝ、又は稀釋を行つて、(大体に於て蒸留水で10倍稀釋を行うのが適當である)、之に硫酸第2鉄磷酸溶液($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 5gを80%磷酸100ccにとかし、蒸留水と共に1lとしたもの)

2.0ccを加え、発色せしめ、予め作製してある黄血塩溶液の発色程度(第4図)と光電比色計で比色を行う。光電比色は液0.5cmのセルを用いた。但し浸出液の HgCl_2 との濁濁測定の際は2.0cmのセルを使用した。

試料はビンナガマグロの鮮度良好なものを用い(揮発性塩基窒素18.0mg/100g)この10倍水浸出濾液に上記の如く尿素変性を行わしめたものを実験した。



第4図 黄血塩濃度(ミリモル)と光電比色計の吸光度との関係(液層0.5cm)

第69表 ビンナガマグロ水浸出液の尿素処理と HgCl_2 の混濁形成

尿素濃度 モル	尿素添加後 15分の発色 $-\log \frac{I}{I_0}$	相当黄血 塩濃度 ミリモル	HgCl_2 との 混濁形成 $-\log \frac{I}{I_0}$	尿素添加後 3時間の発 色 $-\log \frac{I}{I_1}$	相当黄血 塩濃度 ミリモル	HgCl_2 との混 濁形成 $-\log \frac{I}{I_0}$
0.1	0.20	0.12	0.14	0.20	0.12	0.38
0.5	0.20	0.12	0.11	0.22	0.13	0.24
1.0	0.21	0.13	0.07	0.24	0.15	0.11
5.0	0.37	0.22	0.02	0.36	0.21	0.02
0	0.19	0.11	0.14	0.19	0.11	0.14

一般に蛋白質の尿素変性の場合、尿素濃度が5モル以上に及ばないとSH基の出現は起らないと考えられているが³⁰⁾、第69表の実験結果から、5モル尿素存在の下で HgCl_2 との混濁形成が最も少ないのは注目される。若し共存する多量の尿素が反応を妨げていないものとするれば、単なる尿素変性だけでは、 HgCl_2 との沈澱は起らないと考えられる。共存する尿素の影響は明らかでないが、一応赤血塩還元力によつて示されるSH活性化は確實な事実であるから、これが他の未変性の水浸出液と比べて何等変らず、沈澱形成を行わないとすると、SH基單獨では全蛋白を沈澱にまでもたらず事はないものと考えられる。

B) 魚肉の尿素液による抽出液と HgCl_2 沈澱形成の有無

ビンナガマグロ肉を0.1, 0.5, 1.0, 5.0Mの尿素液で1時間浸出後, その濾液10.0ccに0.05M HgCl_2 5.0 ccを加えたが, 全く沈澱形成を認め得なかつた。

この場合の各抽出液のSH基測定値は第70表の如くである。

第70表 ビンナガマグロ肉の尿素抽出液の HgCl_2 との濁濁形成

尿 素 濃 度 モル	$\frac{\text{N}}{1000} \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ cc	HgCl_2 との濁濁形成 $-\log \frac{I}{I_0}$
0.1	1.1	0.42
0.5	1.2	0.34
1.0	1.2	0.15
5.0	2.7	0.09
0	1.1	0.40

以上によつて少くとも, 尿素変性の程度のSH基活性化では HgCl_2 沈澱に大きな役割を演ずることは不可能と思われる。

4) 魚肉の稀薄アルカリ抽出とSH基の生成並に HgCl_2 沈澱の形成

新鮮なビンナガマグロ肉(全窒素4.53%, 蛋白質窒素3.51%, N, 2項記載)を稀薄アルカリで抽出し, その濾液と HgCl_2 との反応をしらべ, 併せて液中のSH基並にアミノ酸態窒素を測定した結果は第71表の如くである。

第71表 ビンナガマグロ肉の稀薄アルカリ抽出とSH基の生成並に HgCl_2 沈澱

浸出液100ccに含まれる 0.1N NaOH cc	0	1.0	3.0	5.0	7.0	9.0
浸 出 液 PH	5.95	6.05	6.30	6.66	6.80	6.99
HgCl_2 沈 澱 窒 素	—	837	864	923	968	1086
ア ミ ノ 酸 窒 素	140	149	183	160	168	245
$\frac{\text{N}}{1000} \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 滴定値 cc	0.41	0.29	0.21	0.19	0.19	0.20

この表から既述したように, 蛋白の軽度の水解を示すアミノ酸窒素の離脱が見られるが, SH基の顕著な増量はみられない。変性条件にもよると思われるが, 尿素変性のSH増加による HgCl_2 に対する反応性がうすいこと, アルカリ処理で, SH基の増加が認められず, アミノ基の増加に伴つて, HgCl_2 沈澱窒素量の増加することから考えて, 本沈澱現象に於て HgCl_2 に対する活性基としてはSH基は第二義的な意義しかもたないものではないかと考える。

更に興味あることは, イカ肉蛋白の場合であるが, これは後述するようにフォルマリン

及び沃度醋酸の添加によつて、 HgCl_2 沈澱を阻止することが出来ない。但しイカ肉の HgCl_2 沈澱窒素は一部フォルマリンで減少せしめることは出来るからこの場合も、専らアミノ基その他の活性基が反応の主体をなすものと思われる。

5) 魚肉の鮮度低下とSH基の出現並に HgCl_2 沈澱との關係

魚肉の鮮度低下に伴つてSH基の出現に就ては文献の項に述べたようにこれを新鮮度との關係に於て扱つた森、秦の研究があるが、同氏らの報告によれば、 37°C 22時間程度の放置では赤血塩の還元が、時間と共に増大する事實を確認している。然しながら更に腐敗が進行すれば必ずしも還元力が増加せずして、逆に減少する事實すらある。この点に就て前記両氏は觸れて居ないのであるが一方、 HgCl_2 との沈澱現象は何等減少を見ないのであるから、やはりSH基が本沈澱を左右する主要な活性基であるとは認め難いように思う。

実験は、水分73.0%，全窒素4.04%，蛋白窒素3.53%のビンナガマグロを 25°C に放置して腐敗せしめ、その経過と、SH基、 NH_2 基、揮発性塩基窒素の増大と、 HgCl_2 沈澱の形成をしらべたもので第72表にその結果を示す。

第72表 ビンナガマグロの腐敗経過とSH基、 NH_2 基及び HgCl_2 沈澱窒素の変化

	0	1	2	3	4	5
10倍浸出液5.0ccについて N 1000 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 滴定値	1.14	1.92	2.65	1.24	0.90	0.83
アミノ酸窒素	155	126	91	105	176	344
揮発性塩基窒素	19	22	134	175	314	323
HgCl_2 沈澱窒素	—	615	1236	981	1112	784

これでわかるようにSH基は揮発性塩基窒素100mg/g前後を最高として、以後減少するのが見られる。即ち新鮮時に保有していた量以下に減少しても、なほ HgCl_2 の沈澱が相当量起きるということは、上記の通り、SH基以外の活性基の消長がむしろ主体をなすと考えられる。

蛋白質活性基を封鎖する試薬として、フォルマリン、モノ沃度醋酸の2種を選んだのであるが、この両者は共に、 NH_2 基SH基を封する性質があり、このためにSH基だけの活性基の影響と分離して探究することが困難であるが一応、上記の諸実験からSH基のみが主体的ではないとする考え方も妥当であると思う。

殊に第V、6項に示したゼラチンの腐敗の場合、 HgCl_2 沈澱形成は、Sを含まないゼラチン液中に於ても、充分起るのであるから、その点からも、他の塩基の基群を結合の主体と考えても無理でないと思う。

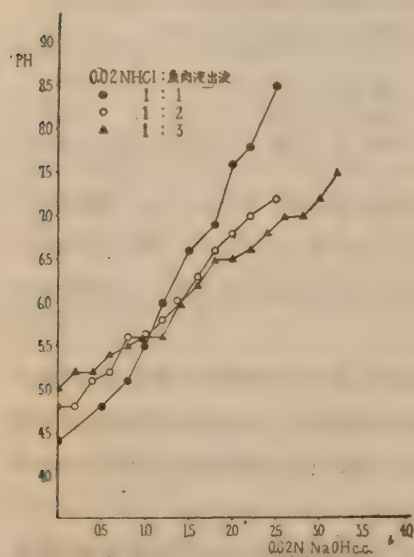
6) 魚肉の腐敗とその水溶性蛋白質の等電點の變化

HgCl₂との結合の主体が、アミノ基はじめ、グアニジン基イミダゾール基等の塩基性基にあるとすると当然魚肉の腐敗に伴つて、水溶性蛋白質の等電點が、アルカリ側に移動する筈である。そこで、魚肉水浸出液に就て簡易な滴定曲線による等電點測定を実施した。実験法は正確に標定した $\frac{N}{50}$ -NaOH 及び $\frac{N}{50}$ -HCl を作製、 $\frac{N}{50}$ -HCl 1.0cc に対し、魚肉水浸出液 1.0, 2.0, 3.0cc を夫々加えた、混合液を 50 cc ビーカーにとり、この混合液に $\frac{N}{50}$ NaOH を 0.2cc 宛滴加してその都度、混合液の pH を東洋濾紙製の pH 試験紙 (B. C. G. M. R., B. T. B., T. B) の細片 (約 4mm²) を用いて判定、N/50 NaOH 注加量と pH の変化とを、滴定曲線に描き、2~3 曲線の交点を求めてその等電域とする方法⁹⁵⁾である。

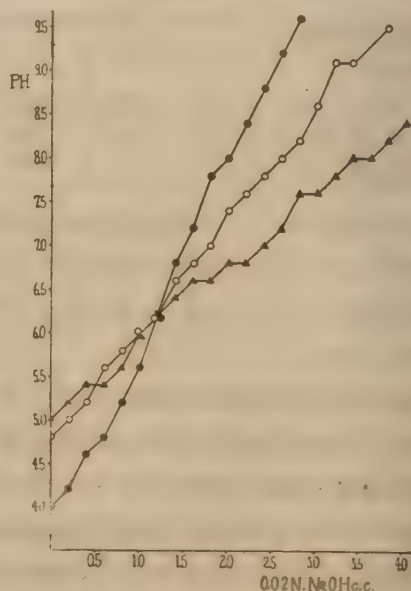
滴定を続けてゆくと、先ず極めて薄い皮膜状の凝固物が微量出現し、それ以後増加せず次に溶液全体が濁濁を呈し、やがてそれが凝固し、漸次 N/50 NaOH 量の注加と共に、pH 9.6 前後で、再び凝固が溶解するようになる。

試料は第Ⅰ，2B 項に掲げたクロカハカジキで好氣的腐敗条件と、嫌氣的腐敗条件とに分けて放置したものを、逐日その10倍水浸出液に就て測定を行つたものである。

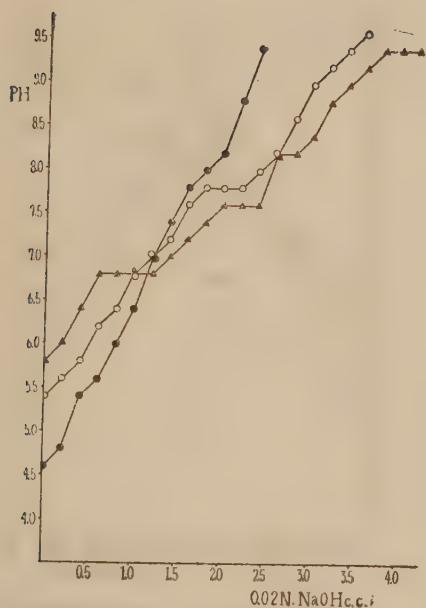
得られた滴定曲線は附図 (5~25) の通りであるが、これを3種の滴定曲線の交叉する位置から、等電域を判定すると第73表の如くなる。



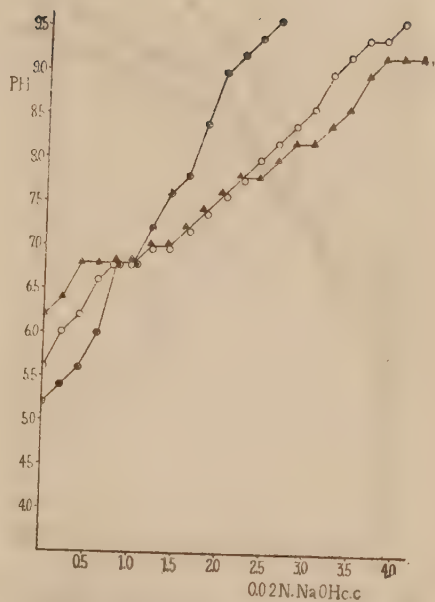
第5図
クロカハカジキ水浸出液滴定曲線
(第9日)



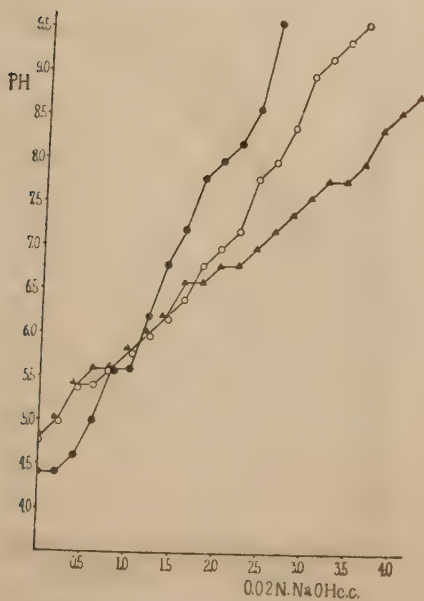
第6図
クロカハカジキ水浸出液滴定曲線
(好氣的腐敗区第1日)



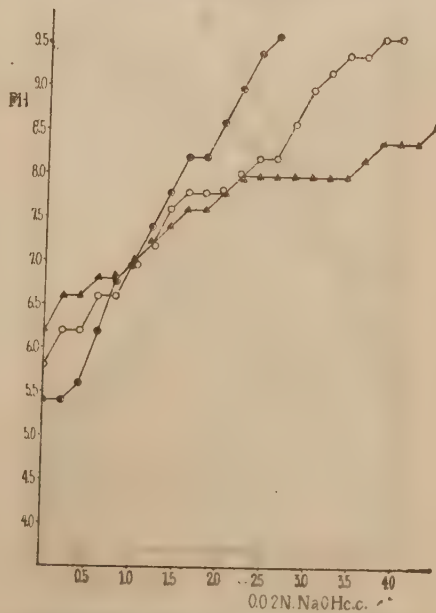
第7図 クロカハカジギ水浸出液滴定曲線
(好気的腐敗区第2日)



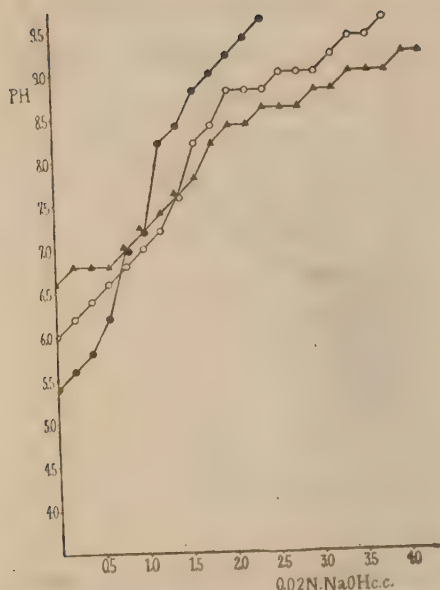
第8図 クロカハカジギ水浸出液滴定曲線
(好気的腐敗区第3日)



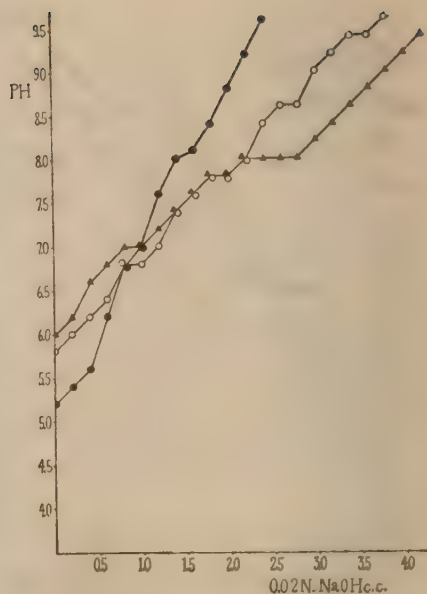
第9図 クロカハカジギ水浸出液滴定曲線
(好気的腐敗区第4日)



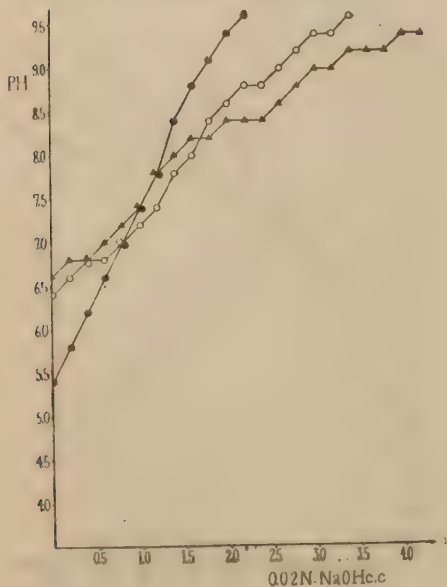
第10図 クロカハカジギ水浸出液滴定曲線
(好気的腐敗区第5日)



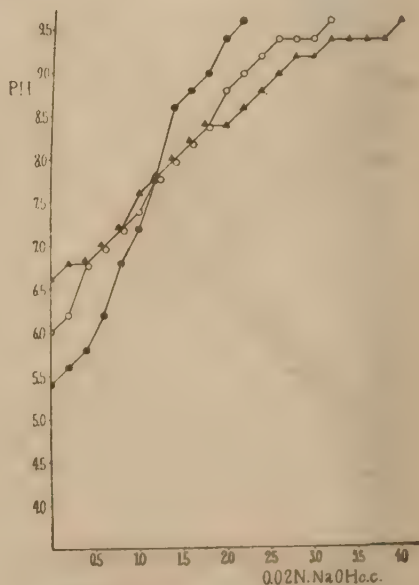
第 11 図 クロカハカジキ水浸出液滴定曲線
(好気的腐敗区第 6 日)



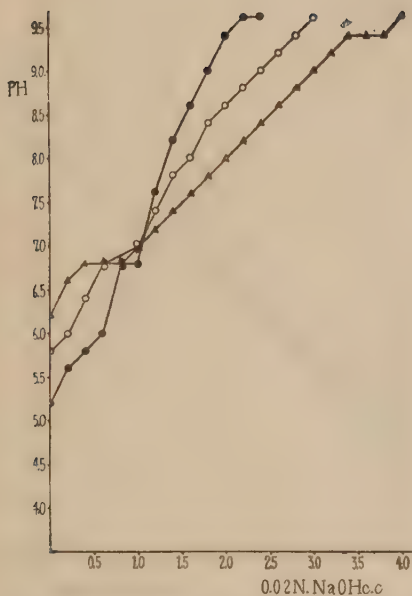
第 12 図 クロカハカジキ水浸出液滴定曲線
(好気的腐敗区第 7 日)



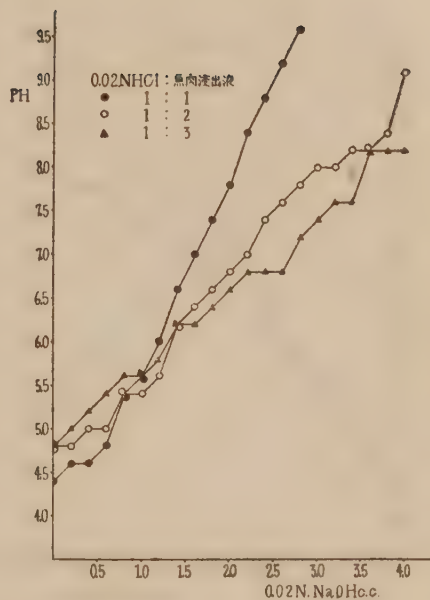
第 13 図 クロカハカジキ水浸出液滴定曲線
(好気的腐敗区第 8 日)



第 14 図 クロカハカジキ水浸出液滴定曲線
(好気的腐敗区第 9 日)



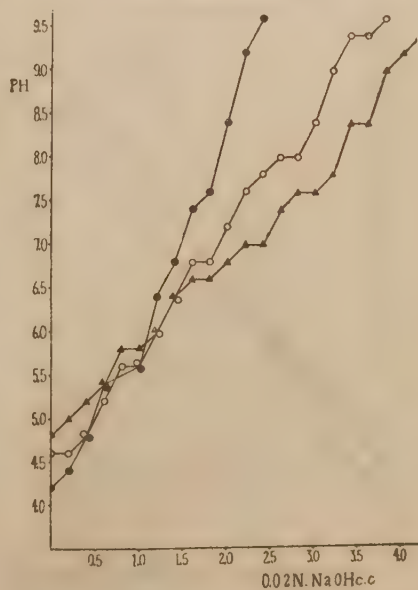
第15図 クロカハカジキ水浸出液滴定曲線
(好気的腐敗区第10日)



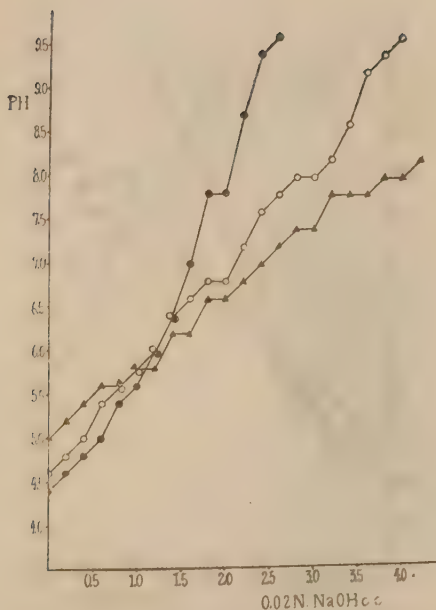
第16図 クロカハカジキ水浸出液滴定曲線
(嫌気的腐敗区第1日)



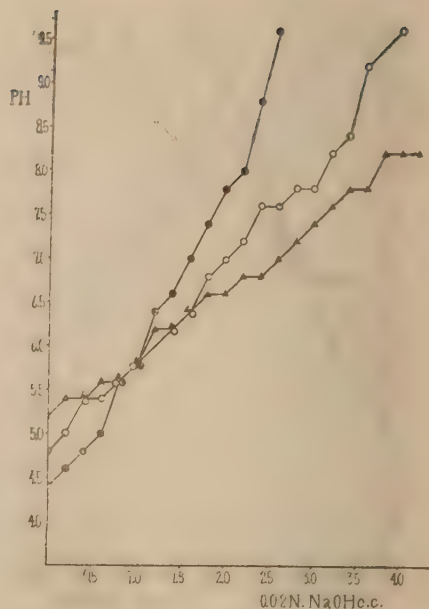
第17図 クロカハカジキ水浸出液滴定曲線
(嫌気的腐敗区第2日)



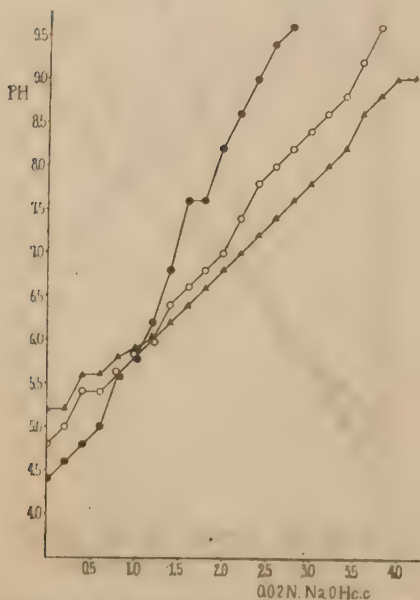
第18図 クロカハカジキ水浸出液滴定曲線
(嫌気的腐敗区第3日)



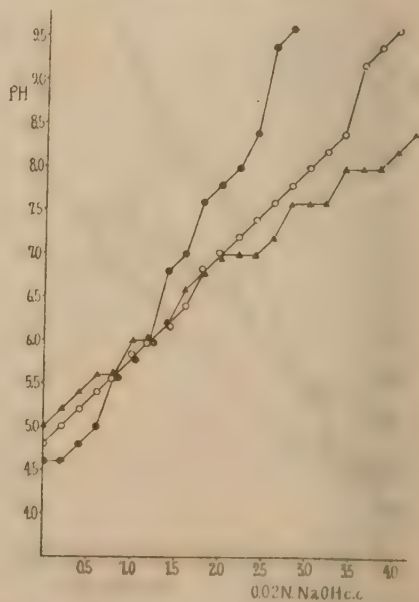
第19図 クロカハカジキ水浸出液滴定曲線
(嫌気の腐敗区第4日)



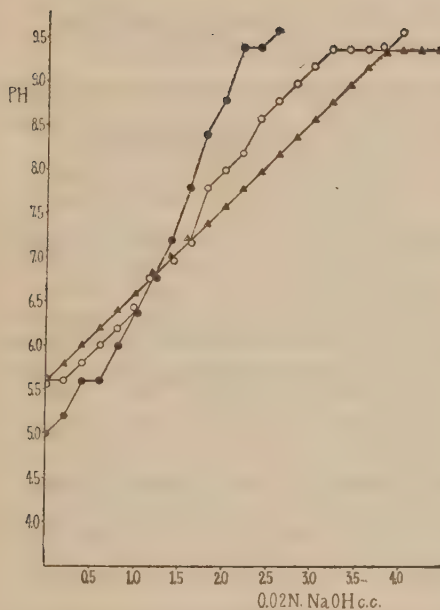
第20図 クロカハカジキ水浸出液滴定曲線
(嫌気の腐敗区第5日)



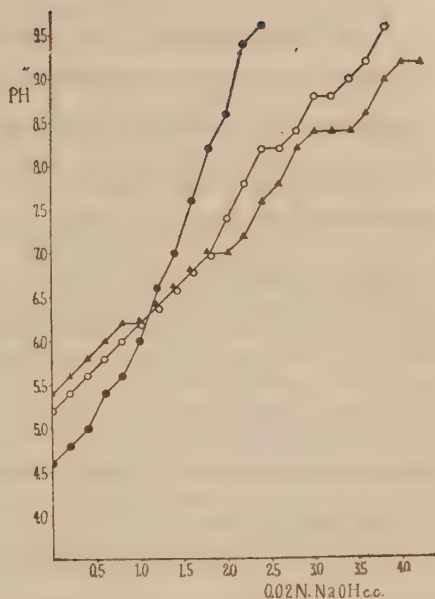
第21図 クロカハカジキ水浸出液滴定曲線
(嫌気の腐敗区第6日)



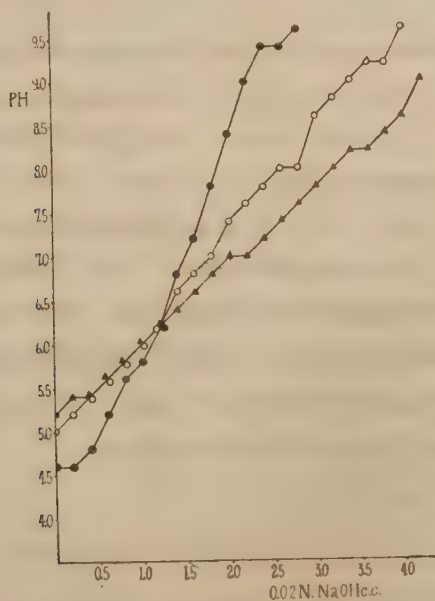
第22図 クロカハカジキ水浸出液滴定曲線
(嫌気の腐敗区第7日)



第23図 クロカハカジキ水浸出液滴定曲線
(嫌気の腐敗区第8日)



第24図 クロカハカジキ水浸出液滴定曲線
(嫌気の腐敗区第9日)



第25図 クロカハカジキ水浸出液滴定曲線
(嫌気の腐敗区第10日)

第73表 クロカハカジキ肉の腐敗経過とその水浸出液中蛋白質の滴定曲線による
等電域の推移

放 置 日 数	0	1	2	4	5	6
好氣的腐敗区水浸出液 pH	5.6	5.6	6.0	6.4	6.6	6.0
同 等 電 域	5.4~5.6	5.4~5.6	6.0~6.2	6.8~7.0	6.8	5.9~6.6
同 昇 汞 沈 澱 反 応	—	—	+	+	+	+
嫌氣的腐敗区水浸出液 pH	5.6	5.6	5.8	5.6	5.8	5.8
同 等 電 域	5.4~5.6	5.4~5.6	5.4~5.6	5.4~5.6	5.4~5.8	5.6~6.0
同 昇 汞 沈 澱 反 応	—	—	—	—	±	—

放 置 日 数	7	8	9	11	13	16
好氣的腐敗区水浸出液 pH	6.8	7.0	6.6	7.0	7.8	7.4
同 等 電 域	6.8~7.2	6.6~7.2	6.8~7.0	6.8~7.4	6.8~7.2	6.8~7.2
同 昇 汞 沈 澱 反 応	+	+	+	+	+	+
嫌氣的腐敗区水浸出液 pH	5.8	5.6	5.8	5.8	6.2	6.6
同 等 電 域	5.6~5.8	5.6~6.0	5.6~6.0	6.2	6.2~6.3	6.4~6.8
同 昇 汞 沈 澱 反 応	+	+	+	+	+	+

この結果から、腐敗経過と共に、その水浸出液中の蛋白質の等電点が軟次アルカリ域に傾くことがよく見られる。これらの変化に與る蛋白質中の基群は、アミノ基をはじめ、種々の塩基性基であろうから、腐敗の進行と共に、これが HgCl_2 と反応することは、当然期待出来ると思う。たゞ茲で嫌氣的腐敗区であるが、肉の置かれてある條件をアルカリ性ピロガロールで脱酸素状態としたものであるが、この状態では顯著な腐敗が起りにくい、昇汞沈澱反応も9日目に至つて、陽性を示している。これは肉の初期腐敗に於ては主として好氣性細菌が發育して、嫌氣性細菌が關與することは少いことが知られているから、その好氣性細菌の發育阻止が行われたためと考えられる。嫌氣的腐敗に於ては、勿論好氣的腐敗とはその様相が異なるから、pH の移動が顯著ではない。然し、興味のあることは、pH が5.6~5.8 でも既に蛋白質の崩壊が行われて居れば、充分、 HgCl_2 と反応を示す事実であつて、必ずしも Walkiewicz の觀察の如く pH 6.2 が反応出現の重要前提ではないことである。この事からも、腐敗様式の如何を問はず、 HgCl_2 と反応性を有する活性基の出現が本反応の契機となるものであることを認め得ると考える。

X 魚肉水浸出液中の HgCl_2 沈澱性窒素と HgCl_2 との定量的結合

1) 魚肉水浸出液に加える HgCl_2 量と沈澱窒素量との関係

魚肉水浸出液中の水溶性蛋白質が有する活性基と HgCl_2 との間の結合が大体に於て本沈澱現象の主体をなすものとする、当然その間には定量的結合が期待せられる。定量的結合が存在するものとすれば、それを基礎として沈澱物窒素量と沈澱量との間の比濁的定量も可能となる訳である。そこで第一に、一定濃度の窒素量を有する浸出液に異なる量の HgCl_2 を加えて沈澱する窒素量を測定し、上記の関係をしらべることとした。

試料はビンナガマグロを用い新鮮時と鮮度低下時とに分けて夫々測定を行つた。但し新鮮時の浸出液に於ては、その儘では HgCl_2 沈澱形成が行われないから、浸出液10.0ccに0.05M HgCl_2 1.0~5.0ccを加えたのち無水アルコール20ccを加えて凝固を完結せしめた。鮮度低下時の試料では浸出液10.0ccに1.0~5.0ccの0.05M HgCl_2 を加えたものである。いずれも浸出は 10g:100cc である。

第74表 新鮮ビンナガマグロ肉水浸出液中のアルコール共存の場合の HgCl_2 沈澱窒素量

0.05 M HgCl_2 添加量 cc	沈澱窒素量 mg/100g
1.0	870
2.0	937
4.0	1004
5.0	1007
浸出液中の水溶性全窒素	1540

第75表 鮮度低下ビンナガマグロ肉水浸出液中の HgCl_2 沈澱窒素量

0.05M HgCl_2 添加量 cc	沈澱窒素量 mg/100g
1.0	642
2.0	669
4.0	669
5.0	696
浸出液中の水溶性全窒素	1410

第74, 75表の数値から HgCl_2 の添加量を増してゆくと沈澱窒素量も又増加するのが見られるが、興味のある事実は新鮮肉水浸出液で、アルコールによる蛋白質の水和力低減の場

合にも略々同様の傾向の認められることである。即ち、水溶性蛋白質の HgCl_2 との沈澱現象は新鮮肉に於ても不鮮肉に於ても、本質的には大差なく相似の機構によるものである事が暗示せられる。新鮮時に於ては水分子を強力に結びつけていた親水性基が、水分子のアルコールによる剝奪によつて HgCl_2 との反応性を増すことが考えられ、腐敗時に於ては蛋白質分子の崩壊に伴う活性基の増大が反応性を増すものと考えられる。しかしこのような基群と HgCl_2 との定量的結合が反応の主体をなす点に於て恐らく相似であろうと思う。

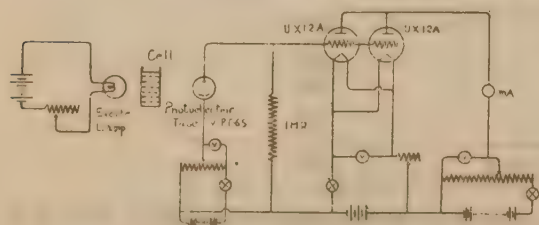
2) 光電比濁計に依る魚肉水浸液と HgCl_2 との沈澱量測定

魚肉水浸出液中の蛋白質その他と HgCl_2 との結合が定量的に行われ得ることを確定する方法として、沈澱量を光電比濁計で測定する実験を行つた。茲で問題となるのは、この沈澱物が Suspension として比濁測定の対象になり得るか否かであるが、幸、光電比濁計での測定時間は1分以内に終り得るので、沈澱量を調節すれば充分測定可能の見込が立つた。勿論、 HgCl_2 沈澱物は腐敗の進行する程、凝固が著しくなるので、均一な濁濁状態を保つためには全液を試験管中でよく振り、凝固物を完全に分散せしめる必要がある。それでもなお腐敗後期の沈澱物は30秒位でまた凝固を呈し液相と分離して測定困難におもひいる。従つて、そのような場合は0.05M HgCl_2 液量と、之に加えられる可き魚肉水浸出量を調節して適当な量、即ち、 HgCl_2 液に対して充分少量な浸出液を加えることが必要である。

既によく知られているように、濁濁液分散相の粒子の大きさが常に一定であり、液層の厚さが一定であるとすると

$$\log \frac{I}{I_0} = -kC$$

となる。 I_0 は入射光量、 I は液層通過後の光量⁹⁶⁾である、著者の実験結果は濁濁度を普通行われるように $-\log \frac{I}{I_0}$ で示した。



第26図 光電比濁測定装置

使用した光電比濁計の装置の大意は第26図に示す通りである。実験方法は魚肉の 10. g : 100 cc の水浸出濾液を用い、この 0.1 乃至 1.0 cc を試験管に採り、蒸溜水を加えて全液 1.0 cc に一定

し、次に0.05M HgCl₂ 10.0ccを加え、全量11.0ccとし、濁濁若くは沈澱を形成せしめ、次に液層2.0cm内容量約12ccの角型硝子製セルに全液を移して、比濁測定を行つた。

A) ビンナガマガロを放置腐敗せしめた例

東京市場より購入した新鮮ビンナガマガロ肉(全窒素4.04%, 蛋白態窒素3.35%, 入手直後の揮発性塩基窒素19mg/100g)を各50.0g宛大型ペトリ皿に入れ 25°C の恒温器中に放置して、連日その全肉を細碎混和したものから10.0gを秤取し、蒸溜水100ccで1時間浸出後、濾過を行い、濾液を上記の如き方法で測定した。

第76表 ビンナガマガロ肉の変敗とその浸出液中のHgCl₂沈澱量の比濁測定

魚肉浸出液量 cc		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
1 日 後	$-\log \frac{I}{I_0}$	0.005	0.005	0.008	0.008	0.01	0.02	0.015	0.025	0.020	0.025
	揮発性塩基窒素	22mg/100g									
	HgCl ₂ 沈澱窒素	615mg/100g									

魚肉浸出液量 cc		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
2 日 後	$-\log \frac{I}{I_0}$	0.08	0.17	0.25	0.31	0.43	0.50	0.57	0.64	0.90	0.78
	揮発性塩基窒素	134 mg/100g									
	HgCl ₂ 沈澱窒素	1236 mg/100g									

魚肉浸出液量 cc		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
3 日 後	$-\log \frac{I}{I_0}$	0.07	0.08	0.14	0.17	0.25	0.27	0.35	0.42	0.42	0.59
	揮発性塩基窒素	175 mg/100g									
	HgCl ₂ 沈澱窒素	981 mg/100g									

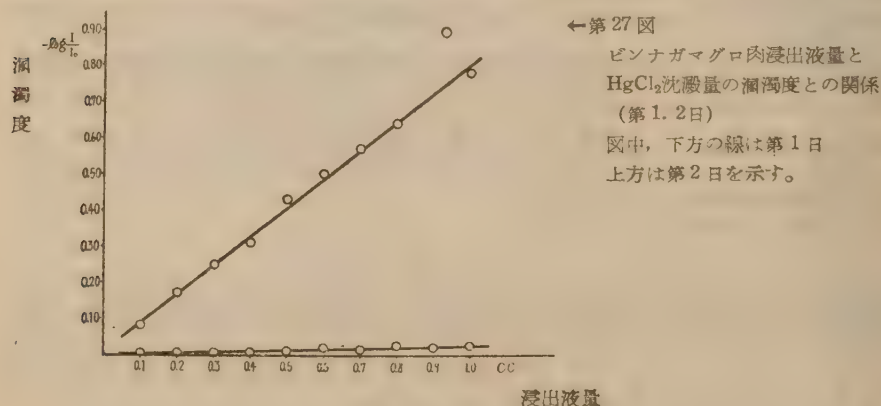
魚肉浸出液量 cc		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
4 日 後	$-\log \frac{I}{I_0}$	0.07	0.10	0.15	0.21	0.25	0.36	0.43	0.52	0.55	0.61
	揮発性塩基窒素	314 mg/100									
	HgCl ₂ 沈澱窒素	1112 mg/100									

魚 肉 浸 出 液 量 cc		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
5 日 後	$-\log \frac{I}{I_0}$	0.07	0.15	0.15	0.24	0.30	0.33	0.39	0.51	0.48	0.51
	揮発性塩基窒素	323 mg/100g									
	HgCl ₂ 沈澱窒素	784 mg/100g									

実測結果は第76表の如くであるが、これを図示したものが第27図乃至第30図である。これらを見ると一定量の HgCl₂ 沈澱窒素を含む魚肉水浸出液の量を変えてゆくと、その増量に応じて $-\log \frac{I}{I_0}$ の値も増加することがわかる。測定例によつて $-\log \frac{I}{I_0}$ の値が直線上から分散する例も見られるが、これは、はじめに述べたように均一な分散状態に濁濁を長時間保持することが困難だからである。このような測定結果から、HgCl₂ 沈澱物が蛋白質その他と HgCl₂ との定量的結合物であることが充分推察出来る。

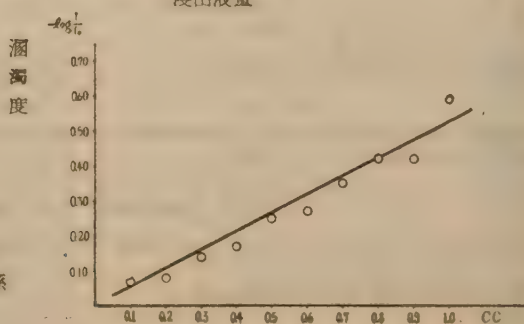
B) ナガスクヂラ肉を放置腐敗せしめた例

南氷洋産冷凍鯨赤肉（第3天洋丸輸送1950.1.26）を用い上記と全く同様な方法で試料処理、放置を行い、比濁測定を行つた結果は第77表の如くである。

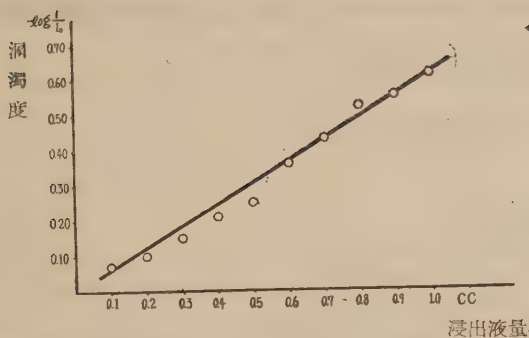


第 28 図→

ビンナガマグロ肉浸出液量と HgCl₂ 沈澱の濁濁度との関係 (第 3 日)

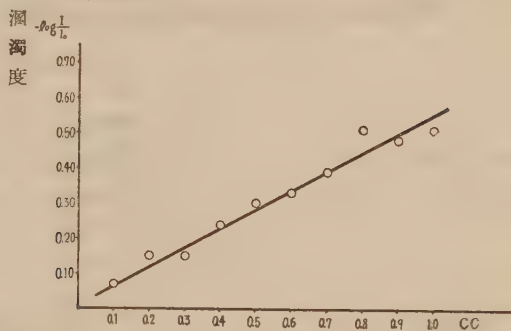


浸出液量



第30図 →

ビンナガマガロ肉浸出液量と
HgCl₂沈澱の濁濁度との関係
(第5日)

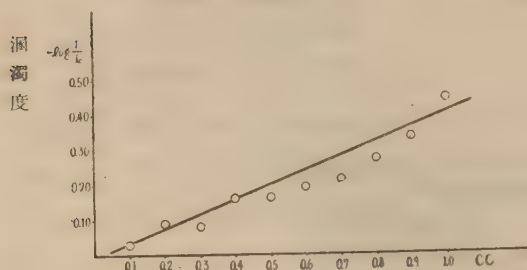


浸出液量

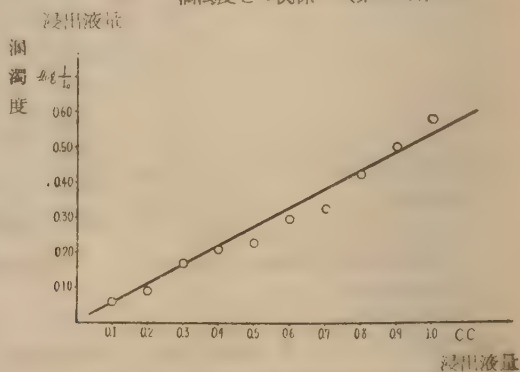
第77表 ナガスクデラ赤肉の変敗とその浸出液中の HgCl₂沈澱量の比濁測定

魚肉水浸出液量 cc		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
2日	$-\log \frac{I}{I_0}$	0.03	0.09	0.08	0.16	0.16	0.19	0.21	0.27	0.33	0.44
後	HgCl ₂ 沈澱窒素 457 mg/100g										
魚肉水浸出液量 cc		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
3日	$-\log \frac{I}{I_0}$	0.06	0.09	0.17	0.21	0.23	0.30	0.33	0.43	0.51	0.59
後	HgCl ₂ 沈澱窒素 575 mg/100g										
魚肉水浸出液量 cc		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
4日	$-\log \frac{I}{I_0}$	0.03	0.05	0.08	0.11	0.14	0.18	0.21	0.25	0.31	0.33
後	HgCl ₂ 沈澱窒素 392 mg/100g										
魚肉水浸出液量 cc		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
5日	$-\log \frac{I}{I_0}$	0.04	0.07	0.09	0.14	0.17	0.22	0.23	0.25	0.37	0.36
後	HgCl ₂ 沈澱窒素 326 mg/100g										

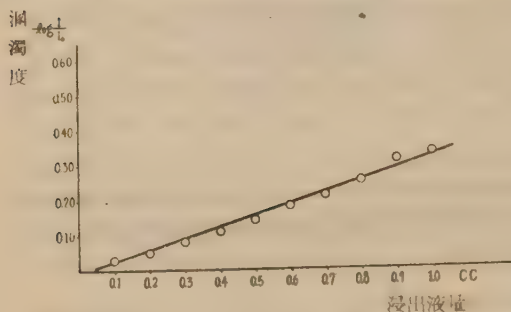
これをグラフに図示した結果は第31図乃至第34図の如くであつて、大体に於て浸出液量と濁濁の増加割合との間には直線的な関係の存在することが見出される。



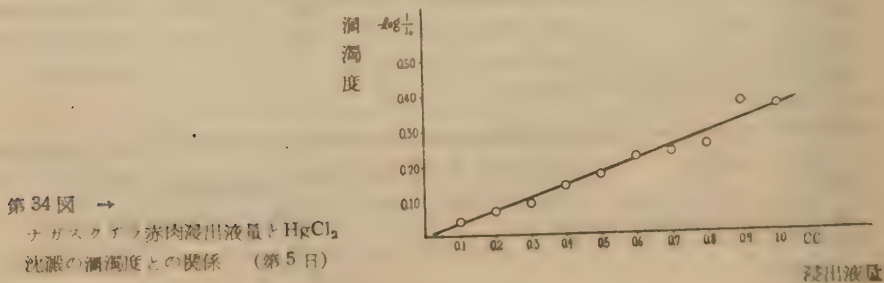
← 第31図
ナガスクデラ赤肉浸出液量と HgCl₂ 沈澱の濁濁度との関係 (第2日)



第32図 →
ナガスクデラ赤肉浸出液量と HgCl₂ 沈澱の濁濁度との関係 (第3日)



← 第33図
ナガスクデラ赤肉浸出液量と HgCl₂ 沈澱の濁濁度との関係 (第4日)



第34図 →
ナガスクデラ赤肉浸出液量と HgCl₂ 沈澱の濁濁度との関係 (第5日)

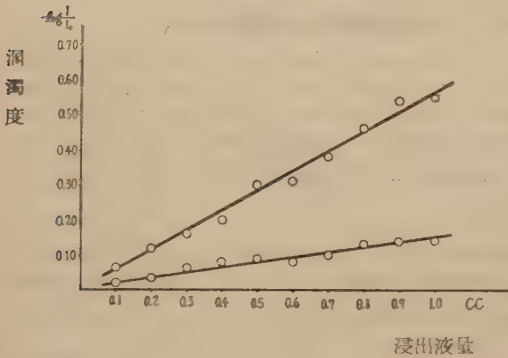
C) カツヲを放置腐敗せしめた例

東京市場より購入せるカツヲ肉（揮発性塩基窒素8.1mg/1.00g）を7月の室温（27.5°及31°C）に放置し腐敗に至らしめ、10倍水浸出濾液を自製して、上記同様に潤濁度の測定を行つた結果を第78表に示す。

第 78 表 カツヲ肉の変敗とその浸出液中の HgCl_2 沈澱量の比濁測定

魚 肉 浸 出 液 量 cc		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
1 日 後	$\log \frac{I}{I_0}$	0.013	0.032	0.063	0.078	0.085	0.080	0.098	0.136	0.140	0.141
	揮発性塩基窒素	36 mg/100g									
	HgCl_2 沈澱窒素	739 mg/100g									
		0.065	0.12	0.16	0.20	0.30	0.31	0.38	0.46	0.54	0.55
2 日 後	$-\log \frac{I}{I_0}$										
	揮発性塩基窒素	65 mg/100g									
	HgCl_2 沈澱窒素	868 mg/100g									

これを図示したものは第35図である。このグラフを見ても、浸出液量と潤濁の増加割合との関係は直線的であることが明らかである。



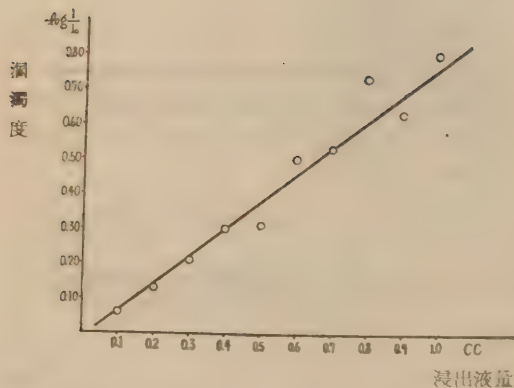
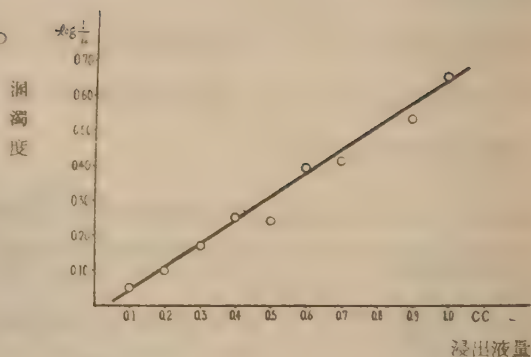
第 35 図

カツヲ肉浸出液量と HgCl_2 沈澱の潤濁度との
関係〔第1日(下)及第2日(上)〕

同様な実験を他のカツヲ肉（揮発性塩基窒素23mg/100g）を27～29°Cの室温に於て試料処理放置を行い上記同様に潤濁度の測定を行つた結果は第79表の如くである。（第36、37図）

第36図 →

カツヲ肉浸出液量と HgCl_2 沈澱の
濁濁度との関係 (第2日)



← 第37図

カツヲ肉浸出液量と HgCl_2 沈澱
の濁濁度との関係 (第3日)

第79表 カツヲ肉の変敗とその浸出液中の HgCl_2 沈澱量の比濁測定

魚肉浸出液量 cc		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
1日	$-\log \frac{I}{I_0}$	0.006	0.008	0.003	0.016	0.011	0.011	0.008	0.017	0.044	0.026
後	揮発性塩基窒素 44mg/100g										
2日	$\log \frac{I}{I_0}$	0.05	0.10	0.17	0.25	0.24	0.38	0.41	0.35	0.53	0.65
後	揮発性塩基窒素 53 mg/100g										
3日	$-\log \frac{I}{I_0}$	0.06	0.13	0.21	0.30	0.31	0.50	0.53	0.73	0.63	0.40
後	揮発性塩基窒素 153 mg/100g										

同様な実験を他のカツヲ肉（入手当日の揮発性塩基窒素17mg/100g）を8月19～21日の室温（28～30℃）に於て試料処理，放置を行い上記同様に涵濁度の測定を行つた結果は第80表の如くである。

第80表 カツヲ肉の変敗とその浸出液中の HgCl_2 沈澱量の比濁測定

魚肉浸出液量 cc		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
1日	$-\log \frac{I}{I_0}$	—	0.023	0.037	0.046	0.050	0.035	0.131	0.145	0.239	0.19
後	揮発性塩基窒素 53mg/100g										

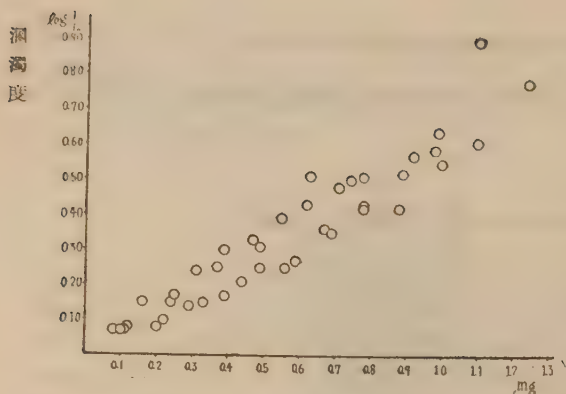
		0.11	0.037	0.062	0.068	0.084	0.11	0.17	0.15	0.20	0.25
2日	$-\log \frac{I}{I_0}$										
後	揮発性塩基窒素 148mg/100g										

3) 魚肉水浸出液中の HgCl_2 沈澱窒素量と HgCl_2 涵濁度との關係

上記の実験中ビンナガマグロとナガスケヂラの場合，その都度 HgCl_2 沈澱窒素量を測定し，比濁測定に使用した0.1～1.0cc中の HgCl_2 沈澱窒素量を算出し，その時の涵濁度と，その全液中の HgCl_2 沈澱窒素量との關係を求めると，第81表，82の如くなる。

第81表 ビンナガマグロ肉の水浸出液中に含まれる HgCl_2 沈澱窒素と涵濁度($-\log \frac{I}{I_0}$)
(窒素量は浸出液中の mg 数)

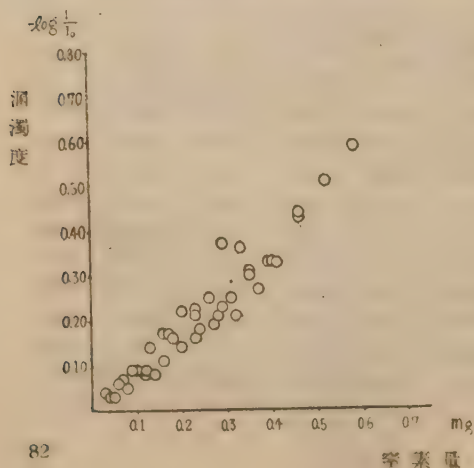
放 置 日 数	2 日 後		3 日 後		4 日 後		5 日 後	
	HgCl_2 沈澱 N	$\log \frac{I}{I_0}$	HgCl_2 沈澱 N	$\log \frac{I}{I_0}$	HgCl_2 沈澱 N	$\log \frac{I}{I_0}$	HgCl_2 沈澱 N	$\log \frac{I}{I_0}$
浸 出 液 量 cc								
0.1	0.12	0.08	0.10	0.07	0.11	0.07	0.08	0.07
0.2	0.25	0.17	0.20	0.08	0.22	0.10	0.16	0.15
0.3	0.37	0.25	0.29	0.14	0.33	0.15	0.24	0.15
0.4	0.49	0.31	0.39	0.17	0.44	0.21	0.31	0.24
0.5	0.62	0.43	0.49	0.25	0.56	0.25	0.39	0.30
0.6	0.74	0.50	0.59	0.27	0.67	0.36	0.47	0.33
0.7	0.87	0.57	0.69	0.35	0.78	0.43	0.55	0.39
0.8	0.99	0.64	0.78	0.42	0.89	0.52	0.63	0.51
0.9	1.11	0.90	0.88	0.42	1.00	0.55	0.71	0.48
1.0	1.24	0.78	0.98	0.59	1.11	0.61	0.78	0.51



第38図 ピンナガマグロ浸出液中に含まれる HgCl_2 沈澱室素と濁濁度との関係

第82表 ナガスクデラ赤肉の水浸出液中に含まれる HgCl_2 沈澱室素と濁濁度
 $-\log \left(\frac{I}{I_0} \right)$ (室素量は浸出液中の mg 数)

放置日数	2 日 後		3 日 後		4 日 後		5 日 後	
	HgCl_2 沈澱N	$\log \frac{I}{I_0}$	HgCl_2 沈澱N	$\log \frac{I}{I_0}$	HgCl_2 沈澱N	$\log \frac{I}{I_0}$	HgCl_2 沈澱N	$\log \frac{I}{I_0}$
0.1	0.05	0.03	0.06	0.06	0.04	0.03	0.03	0.04
0.2	0.09	0.09	0.12	0.09	0.08	0.05	0.07	0.07
0.3	0.14	0.08	0.17	0.17	0.12	0.08	0.10	0.09
0.4	0.18	0.16	0.23	0.21	0.16	0.11	0.13	0.14
0.5	0.23	0.16	0.29	0.23	0.20	0.14	0.16	0.17
0.6	0.27	0.19	0.35	0.30	0.24	0.18	0.20	0.22
0.7	0.32	0.21	0.40	0.33	0.28	0.21	0.23	0.23
0.8	0.37	0.27	0.46	0.43	0.31	0.25	0.26	0.25
0.9	0.41	0.33	0.52	0.51	0.35	0.31	0.29	0.37
1.0	0.46	0.44	0.58	0.59	0.39	0.33	0.33	0.36



第39図
 ナガスクデラ赤肉浸出液中に含まれる HgCl_2 沈澱室素と濁濁度との関係

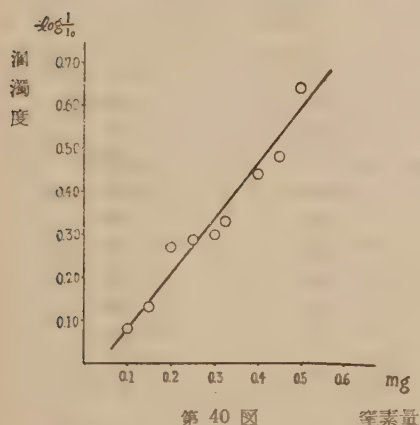
第82表の図示(第39図)を見るとピンナガマグロの場合よりは、稍分散が小さく、
 沈澱室素量と濁濁度との間には明かな直線
 関係があることが認められるであらう。

4) 白降汞 (mercuric amminochloride) の比濁測定

HgCl₂ による蛋白沈澱反応の比濁測定の一基準としてアムモニアと HgCl₂ との間の白色沈澱物 Hg (NH₂) Cl の濁濁度をしらべた。この場合に於ても白降汞が液中に完全に分散している事は殆どないので、極めて稀薄な濁濁液に就て比濁測定を行う方が有利である。NH₃—N の量として 1.0cc 中 0.1 ~ 0.5mg を含有する液を正確に作り、10.0cc の 0.05MHgCl₂ 液に滴下して生ずる濁濁を上記の諸実験と全く同じく 2.0cm 液層のセルを使用して測定を行つた。測定結果は第 83 表に示すが如くである。

第83表 Hg (NH₂) Cl の濁濁度

NH ₃ —N 量mg	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50
$-\log \frac{I}{I_0}$	0.08	0.13	0.27	0.29	0.30	0.33	0.44	0.48	0.64



第 40 図

窒素量

白降汞 (mercuric amminochloride) 中の窒素量と濁濁度との関係

この結果を図示すると、濁濁度が略々反応液中に含まれる NH₃—N 量に比例することが察知せられる。(第40図)

一般に比濁測定の精度が悪いのは事実であるが沈澱粒子の分散状態が測定時間以内に变化しないような条件下では、充分光電比濁測定の可能性が認められる。

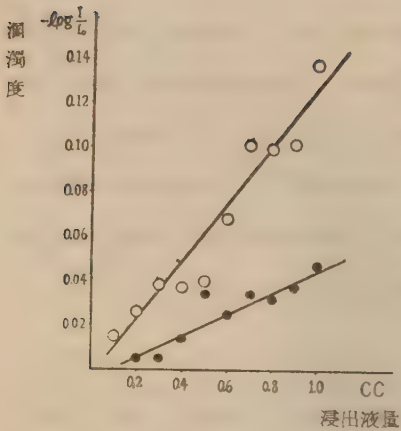
又、以上の諸実験から水溶性蛋白質その他と HgCl₂ との定量的結合も確實に行われるものと考え得られる。

5) 新鮮魚肉の稀薄アルカリ抽出液と HgCl₂

との沈澱物の光電比濁測定

ビンナガマグロ肉を稀薄アルカリ液で浸出した場合、それが HgCl₂ との反応性を増すことは既述したが、その結合物形成がやはり変敗魚肉の場合と同様、HgCl₂ との定量的結合であることを見出し得た。試料は新鮮ビンナガマグロ肉で、蒸留水 100 cc 中に 0.1 N NaOH 7.0cc 及 11.0cc を含有せしめた液で、肉 10.0g を浸出し、その濾液 0.1~1.0cc を採り、蒸留水 0.9~0cc を添加して全液を 1.0cc としたのち、0.05 MHgCl₂ 10.0 cc を加えて反応せしめたものを比濁測定した。(第41図)

第41図 ビンナガマグロ肉稀薄アルカリ浸出液量と HgCl_2 沈澱の濁濁度との関係



又、同じ試料に就て 0.1N NaOH 1.0~11.0cc を含む 100 cc で浸出した各浸出濾液 0.5 cc を用い、0.5 cc の蒸留水を加えて 1.0 cc としたのち、0.05 M HgCl_2 を加えて反応せしめた場合の濁濁度測定結果は第85表の如くである。

第 84 表 ビンナガマグロ肉稀薄アルカリ浸出液と HgCl_2 との沈澱物の比濁測定

浸出液量 cc	0.1N NaOH 7.0cc 添加 (濾液 pH 6.64)		0.1N NaOH 11.0cc (濾液 pH 6.90)	
	HgCl_2 沈澱 Nmg	$-\log \frac{I}{I_0}$	HgCl_2 沈澱 Nmg	$-\log \frac{I}{I_0}$
0.1	0.10	0	0.09	0.015
0.2	0.20	0.005	0.18	0.026
0.3	0.30	0.005	0.27	0.038
0.4	0.41	0.014	0.36	0.037
0.5	0.51	0.034	0.44	0.040
0.6	0.61	0.025	0.53	0.068
0.7	0.71	0.034	0.62	0.112
0.8	0.81	0.032	0.71	0.099
0.9	0.91	0.037	0.80	0.112
1.0	1.01	0.047	0.89	0.137

第85表 ビンナガマグロ肉稀薄アルカリ浸出液のアルカリ濃度と濁濁度

0.1N NaOH 添加量	浸出濾液 pH	$-\log \frac{I}{I_0}$	HgCl_2 沈澱 Nmg / 0.5cc
0	5.57	0.009	—
1	5.71	0.017	0.42
3	6.10	0.015	0.40
5	6.37	0.015	0.38
7	6.64	0.024	0.51
9	6.87	0.037	0.51
11	6.90	0.090	0.44

この場合に於て pHの増大に伴つて濁濁も又増加するが、浸出液中の窒素量は必ずしも平行していない点に注意される。

6) 魚肉浸出液量を一定にした場合の沈澱濁濁度と HgCl_2 濃度との関係

HgCl_2 はその溶解度が小さいために、様々の濃度範囲を選定することが困難であるが、試料液中の HgCl_2 沈澱性の窒素量が一定の場合、 HgCl_2 の濃度によらず濁濁度があまり変化しない事を確かめ得た。使用した HgCl_2 液は 0.005 M (0.135%) ~ 0.05 M (1.35%) HgCl_2 を 10 倍分して、夫々の 10.0 cc を用意しこれに魚肉の 10 倍水浸出液 0.4 cc を加えて反応せしめ生ずる濁濁の比濁測定を行つたのである。此の場合、浸出液 0.4 cc を選んだ理由は生成する沈澱が充分分散して短時間に沈降しない條件で採用し得る最大量で、これ以上例えば 0.6 ~ 1.0 cc では濁濁物を振盪分散せしめても 30 秒乃至 1 分以内に容易に凝集沈降するからである。

試料はカツラ肉で揮発性塩基窒素 148 mg/100 g のものと、ビンナガマグロで同窒素 314 mg/100 g のものを用い、ナガスクデラ赤肉は同窒素 70 mg/100 g のものである。実験結果は第 86 表の如くである。

第 86 表 一定量の魚肉浸出液と異なる濃度の HgCl_2 との間の濁濁度

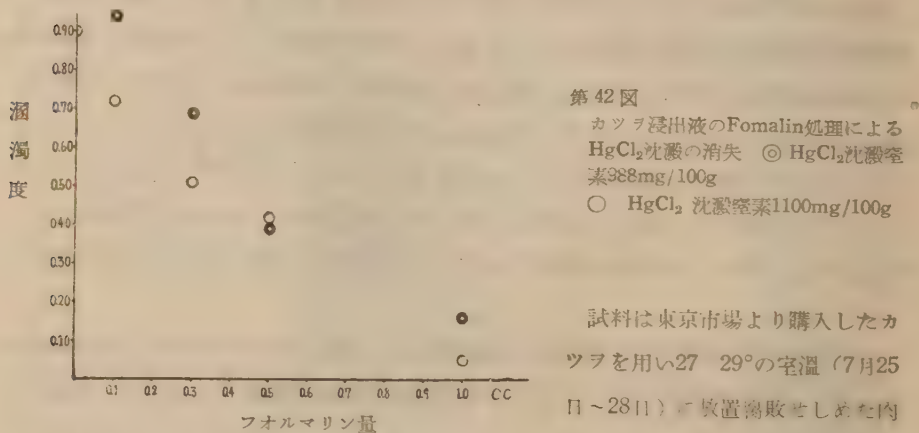
HgCl_2 濃度 モル	カツラ浸出液 $-\log \frac{I}{I_0}$	ビンナガマグロ浸出液 $\log \frac{I}{I_0}$	ナガスクデラ赤肉浸出液 $-\log \frac{I}{I_0}$
0.005	0.09	0.24	0.06
0.010	0.08	0.26	0.06
0.015	0.10	0.26	0.06
0.020	0.09	0.23	0.06
0.025	0.07	0.26	0.05
0.030	0.10	0.39	0.07
0.035	0.09	0.32	0.07
0.040	0.11	0.20	0.07
0.045	0.08	0.31	0.07
0.050	0.07	0.27	0.11

この表で HgCl_2 の濃度差が 1/10 程度あつても、浸出液中の HgCl_2 沈澱性窒素が一定であれば、濁濁度にあまり差のないことがわかる。この HgCl_2 の濃度に関係なく一定量の窒素が示す濁濁形成に変化の少いと云う事は、反応に参加する蛋白質その他と HgCl_2 との定量的結合が確かである事を意味する。

7) 魚肉水浸出液の Formalin 処理による HgCl_2 沈澱の減少の比濁測定

既に第 IX, 1~2 項で述べた通り、 HgCl_2 沈澱反応を呈するような魚肉水浸出液を、フォル

マリン、沃度醋酸で処理したのちに HgCl_2 を加えても沈澱の形成されないことが認められるが、その際これらの試劑の添加量が反応性活性基のすべてを封鎖するに至らない場合に於ては HgCl_2 沈澱の出現が認められる。この際のフォルマリン添加量によつて HgCl_2 沈澱の減少する程度を濁濁度の測定からしらべた結果を述べる。



の浸出液5.0ccをとり、これに35%フォルマリン、0.1~1.0ccを加えたのち、0.05N HgCl_2 5.0ccを加え生じた濁度を光電比色計で測定した。一試料は HgCl_2 沈澱窒素1100mg/100g他の試料は988mg/100gである。第87表はその測定結果であるが図示してみると(第42図)フォルマリン添加量に応じて HgCl_2 沈澱量が直線的に減少することがよくわかる。

第87表 Formalin処理による HgCl_2 沈澱減少の比量測定による判定

Formalin 添 加 量 cc	HgCl_2 沈澱N (1100mg/100g) $\log \frac{1}{I_0}$	HgCl_2 沈澱N (988mg/100g) $\log \frac{1}{I_0}$
0	0.90	0.98
0.1	0.72	0.94
0.3	0.51	0.69
0.5	0.42	0.33
1.0	0.05	0.16

即ち、フォルマリン量に応じて順次活性基が封鎖せられ、そのために HgCl_2 沈澱も減少することが示され、 HgCl_2 との定量的結合の所在が観取出来る。

XI HgCl_2 沈澱現象による蛋白質分子の腐敗による分解の觀察

魚肉蛋白質が腐敗による分解を受ける際、より低分子の構造をとるであろうことは當然期待される。既述の如き検討の結果から、 HgCl_2 が蛋白質の活性基と定量的結合を行うこ

とが確かであるとすれば、高分子の場合と低分子の場合とで当然その結合量に相違を生ずるものと考えられる。蛋白質の主体をなすと信ぜられるポリペプチドが、その蛋白質に於てどのような立体的構造をとるかは未だ定説はないが、長い鎖状のペプチドが捲き込まれた形であるとしても、或は又一定の長さのペプチド連鎖が層状構造を成すにしても、ペプチドに附随する HgCl_2 と作用し得る基がペプチド分子相互間に内在していたり、或は相互間の結合に與つて、蛋白質分子表面に露出しない以上、 HgCl_2 と結合する余地はない筈である。それが変性、腐敗等によつて解展 (unfold), または水解すれば当初に比してより多くの作用基が反応可能圏に出現して来る訳であろう。従つて、そのような場合、 HgCl_2 の結合量も変敗前の蛋白質に比較して増加すると考えてよいであろう。

そこで HgCl_2 との沈澱物中の Hg を定量し、同時に N を定量し、これから N/Hg の比を算出して、これを腐敗経過に応じて追つて行けば蛋白質分子が大きければ大きい程その値は大に、低分子となるに従い、その値は小さくなるものと考えられ、前者はその新鮮な場合、後者は腐敗が進んだ場合に認められるようになるであろう。

このような考え方から魚肉の腐敗経過とその水浸出液中の HgCl_2 沈澱物中の N と Hg とを測定し、その比を計算した結果、大体に於て所期の結果が得られた。

実験方法は魚肉の10倍水浸出液10.0ccに0.05M HgCl_2 5.0ccを加えて沈澱を生ぜしめ、これを濾別し、沈澱中の窒素を測定し、一方全濾液中の HgCl_2 を第IX、2項に記載の方法によつて定量し、0.05M HgCl_2 5.0cc中の Hg は49.82mg であるから、この値から濾液中の Hg 値を控除した量を以て沈澱中の Hg とする方法によつた。

極めて新鮮な魚肉水浸出液での HgCl_2 窒素量に沈澱そのものを生じないために測定は困難であるが、軽度の鮮度低下で極く僅かの濁濁(沈澱とならず長時間濁濁状態をつづける)を生じた場合にはこれをNo. 5B濾紙(東洋濾紙)で濾過し、蒸留水洗滌ののち、濾紙中の窒素と濾液中の Hg とを測定した。但しこの場合、濁濁液は濾紙を通過し、濾液は、濾過前と殆ど同様の濁濁状態を呈した。

1) 腐敗過程と N/Hg の變化

A) ビンナガマダロの実験例

全窒素4.04%, 蛋白態窒素3.53%, 水分73.0%のビンナガマダロを50.0g宛ペトリ皿に收め、25°Cの恒温器中に放置して腐敗に至らしめ、連日、分析を行つた。但し、4日後及び5日後の場合は0.05M HgCl_2 10.0ccを加えた。5.0ccでは沈澱が不完全だからである。

第 88 表 ビンナガマダロ肉の変敗とその水浸出液中の HgCl_2 沈澱のN/Hgの變化

放置日数	揮発性塩基 窒素 mg/100g	水溶性全窒 素 mg/100g	HgCl ₂ 沈澱 窒素 mg/10cc	濾液中の Hg mg	HgCl ₂ 沈澱 物中 Hg mg	N : Hg
0	19	1165	—	—	—	—
1	22	1177	6.15	30.1	19.7	.31
2	134	1576	12.36	24.1	25.8	.48
3	175	1621	9.81	24.4	25.5	.39
4	314	1609	11.12	53.7 *	45.9	.24
5	322	1831	7.84	43.1 *	55.1	.14

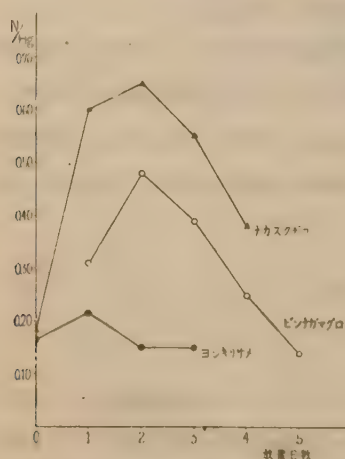
* 0.05M HgCl₂ 10.0cc 使用

B) ナガスクデラ赤肉の実験例

全窒素3.57%の南水洋産冷凍鯨肉を用い、上記と同様に処理して25°Cに放置腐敗せしめたものを連日分析し、この場合は上記のビンナガマグロ肉で得られた1日後のN/Hgの値に鑑みて、特に第1日の試料に就ても測定を行つた。

第89表 ナガスクデラ赤肉の変敗とその水浸出液中のHgCl₂沈澱のN/Hgの変化

放置日数	揮発性塩基 窒素 mg/100g	水溶性全窒 素 mg/100g	HgCl ₂ 沈澱窒 素 mg/10cc	濾液中の Hg mg	HgCl ₂ 沈澱 物中 Hg mg	N : Hg
0	19	1004	4.69	24.1	25.7	.18
1	53	938	7.36	37.6	12.2 *	.60
2	149	1038	8.04	37.6	12.2	.66
3	174	1117	8.04	35.1	14.7	.55
4	311	1205	8.71	27.1	22.7	.38



第43図 ナガスクデラ、ビンナガマグロ
ヨシキリサメの変敗とその濾出液中
のHgCl₂沈澱中のN/Hgの変化

第88, 89表の実験成績から見て興味ある事実はN/Hgの比が初期腐敗前では小さく、腐敗の開始と共に高まり、それが更に腐敗が進行することによつて、再び小さくなることである(第43図)このことは一部既に推定した通り、HgCl₂沈澱が顯著に形成し得ないような新鮮状態では、この反応に参加する物質は比較的低分子のものであるので、その量も少く沈降するに至らずコロイド状を呈し、それが初期腐敗に及んで肉のpHの移動その他により、一種の稀薄アルカリ、稀薄塩基抽出の効果と見え、当初に比較して、作用基の多い高

分子の蛋白質が溶出せざるを得なくなり、このような蛋白質は水和性の喪失その他、軽度の分解を受けるために表面に活性基を露呈し、ここに HgCl_2 が結合し、次で腐敗が更に進行するに従い、蛋白質が細分化するために、活性基に加わる N 群が大となり、これに伴つて HgCl_2 の結合の機会も益々大となり、全体の N に対する Hg の比が小さい値をとらざるを得なくなるのではないかと考える。従つて、N/Hg の値の低減化から腐敗過程に於ける蛋白質分子の崩壊がかなり適確に把握出来るものと信ぜられる。この推定が恐らく正しいであろうと思われる有力な事実はこの第90表に示す新鮮肉の稀薄アルカリ抽出の場合の N/Hg の値である。

2) 稀薄アルカリ抽出蛋白質と N/Hg の変化

新鮮なビンナガマグロ肉を 0.1N NaOH 1.0~9.0cc を含む 100cc 蒸留水で、10 倍浸出を行つた試料に就て N/Hg の値をアルカリ濃度との関連に於てしらべた結果は第90表の如くである。

第90表 ビンナガマグロ肉の稀薄アルカリ抽出液中の HgCl_2 沈澱の N/Hg の変化

0.1N NaOH 添加量 浸出液 pH	水 溶性 性 素 mg/100g	アミノ酸態 容 素 mg/100g	HgCl_2 沈澱 容 素 mg/10cc	濾 液 中 の Hg mg	HgCl_2 沈澱 物 中 Hg mg	N : Hg
0 (5.95)	1343	149	—	—	—	—
1 (6.05)	1394	149	8.37	28.1	21.7	.39
3 (6.30)	1820	183	8.64	30.1	19.7	.44
5 (6.66)	1468	160	9.23	25.1	24.8	.37
7 (6.80)	1468	168	9.68	19.1	30.8	.31
9 (6.99)	1609	245	10.86	16.9	32.9	.33

これを見ると、稍アルカリの強い場合、(0.1N NaOH 9.0cc, 約 N/100 程度) ではアルカリによる加水分解の影響を呈するために、若干 N/Hg の値が小さくなるのであるが、それ程水解的影響を及ぼさないようなアルカリ濃度では当初よりも高い値が得られている。(加水分解の程度は既述のようにアミノ酸窒素量の増加から推測される。)

これは純水可溶性の非反応性の蛋白質と異り、稀薄アルカリ可溶のミオシン系の蛋白質が HgCl_2 との活性基を作つて溶出して來たものと解される。しかも、稀薄アルカリ抽出の場合ではあくまで軽度の水解であつて、腐敗の場合の如く蛋白質が細分化せられていないことは N/Hg の値が、.31~.33 程度であつて、腐敗の場合の .14~.24 より遙かに大きい値

を示す事実からもよく理解出来る。即ち、N/Hg の値の比較からその蛋白質のおかれて
いる分解過程が或る程度まで判定出来る事が明かであると思う。

3) 稀薄食塩水抽出蛋白質とN/Hgの變化

おなじくビンナガマグロを用いて 0.01~0.1% NaCl 100cc で各10.0g の肉を浸出した液
に就て HgCl₂ 沈澱物中の N/Hg の値を測定した結果は第91表の如くである、この場合も腐
敗の例と異りこの比の著しい減少はみとめられない。

第 91 表 ビンナガマグロの稀薄食塩水抽出液中の HgCl₂ 沈澱の N/Hg の變化

NaCl 濃度 %	水 溶 性 蛋 白 質 mg/100g	蛋 白 質 mg/100g	HgCl ₂ 沈 澱 蛋 白 質 mg/10cc	濾 液 中 の Hg mg	HgCl ₂ 沈 澱 物 中 Hg mg	N: Hg
0	1329	534	—	—	—	—
0.01	1671	648	7.92	19.1	30.8	.26
0.02	1579	654	7.92	20.1	26.8	.30
0.05	1441	766	8.64	22.1	27.8	.31
0.10	1365	732	6.61	20.1	29.8	.22

この結果に於て、稍濃度の高い抽出液の場合は値が小さく得られているのであるが、此
のことから、直ちに高濃度のNaClの場合に溶出蛋白質の一部低分子化が行われるかどうか
吟味を要するところと思う。稀薄ブルカリ処理の場合の如く水解のような現象が起るとい
うことは普通考え難いところであるが最近、Woods Holeの^{191, 192, 193)}Szent—Gyorgyi は筋肉の収
縮現象に因してミオシンアクチン及アデノシン3磷酸の3者間の附加或は遊離を以て説明し
ている中で、アクチン、ミオシン等が極めて稀薄な Mg イオン、Na イオン等でその形態を
変え、球状のアクチンが紐状のそれに移行し、若くはその逆の行動をとることを述べてい
ることなどから想像して、NaCl 処理による蛋白質分子の形態変化が全く起り得ないことでは
ないと考えられる。この点を追求して、更に食塩による蛋白質分子の低分子化が具体的に
明らかにせられれば、魚肉の塩蔵の際の諸変化を扱う上に一新手段が提供せられるので
はないのかと思われる。

以上の実験の中、腐敗の例に就ては第 43 図に示したが、これで注意されることはN/Hg
の低減化の状況が、かなり規則的に linear に減少している事である。これは蛋白質分子
内に於けるペプチド結合の規則性或はまたペプチド分子内に於ける作用基の排列がかなり
秩序立つたものであり、腐敗によるペプチド結合の開裂に伴つてこれが次々に活性基とし
て、HgCl₂ と反応してゆく事実を示すものではないかと考えられる。

又、興味を惹く他の問題はナガスクデラの腐敗の際の実験結果であるがN/Hgの値が魚
肉に比較して大きいことである。これは蛋白質分子そのものが魚肉の場合より複雑である

ことを意味するようにも想像せられる。仮にその事実が他の面からも立証せられるとすれば、N/Hgの値から蛋白質分子の大きなり、系統なりが類推出來ることとなり、興味深い。

サメ肉の場合は特にこの値が小さいのは、この魚肉の水溶性蛋白質の量が他の魚種に比して異常に少量であるために（サメの腐敗の項に述べる）溶出する含窒素物には低分子のものが多く、更にアムモニアその他の低級窒素化合物が多く参加していることを意味するのであろう。

但し、これらの諸実験で得られた N/Hg の大きさであるが、これが意外に小さい値をとることである。N 及 Hg を夫々 1 原子宛含むような簡単な化合物例えば $\text{Hg}(\text{NH}_2)\text{Cl}$ の如きは、 $\text{N}/\text{Hg}=14/200 \approx 0.07$ となる訳であるが、これを規準に考えたと第 88, 89 表の結果から最大値がビンナガマグロで 0.48, ナガスクデラで 0.66 で僅か 7~10 倍の値をとるに過ぎない、N 1 原子だけを含むような単純なアミノ酸を考えても、僅か 7~10 分子のペプチドと云うことになり、余りに小さいように思われるが検討を要する点である。最近 Mehlらはビュレーツト反応に於ける銅原子はその 1 個が 4 個のペプチドと結合する旨を述べているし、N を含まぬような <C>-OH 基、SH 基等の反応性を考慮に入れれば、今少しく大きな分子を考えることも可能であろう。

とに角、上述のような比較的簡単な実験によつて種々の魚肉蛋白質の性状を比較することも可能であり、更にその肉のおかれている状態が変敗のどの段階にあるかを推定することも出来ると考える。

XII 本沈澱反應適用不能の魚種に就て

本沈澱反応を魚肉の新鮮度判定に用うる場合、イワシ、サバ、サンマ、カツラ、マグロ類（クロマグロ、ビンナガマグロ、クロカハカジキ、メカジキ）クデラ等に対しては充分有効であることが認められたが、サメ類、イカに於ては疑問の点が多いことが経験せられた。

サメ肉の場合では極めて新鮮なものは本反応が陰性であるが、若干の経過時間後には陽性を示すに至る。これはそのアムモニア増量の顯著なためである。また、イカ肉の場合では、如何に新鮮なものを選んでも必ず陽性反応を興えるもので全く適用不可能である。仍てこのサメ、イカの腐敗の特性を検討して、 HgCl_2 沈澱出現の原因をしらべる事とした。

1) サメ肉の腐敗と HgCl_2 沈澱

変敗したサメ肉がアムモニア臭を呈することは古くから知られている事であるが、それ

が本魚種に多く含有せられる尿素に由来するであろう事は容易に想像せられる。野口 (1932)¹⁰⁴⁾に依ればホシザメで約1%の尿素を含有すると云われる。これはサメが含有する全窒素の1/3~1/4量に達する多量である。従つてサメ肉の鮮度低下と共に尿素態の窒素が細菌により消費せられアムモニアとなる機会はかなり多いものと考えられるが、この点に就て正確な結論は與えられていない。最近、森及小林 (1949)¹⁰⁵⁾は-13°Cの低温でヨシキリザメ肉を保存して尿素の減量とアムモニア増量とをしらべ、肉中にウレアーゼの存在し得べきことを述べているが、その増加割合は腐敗による場合に比して遙かに小さいように思われる。この点に就て同年、高橋及田中 (1949)¹⁰⁶⁾は無菌状態に保存したサメ肉よりのアムモニア増加を定量してその数値があまり多くないことを述べ、ウレアーゼの存在に就て一つの疑問を提出したが甚だ興味ある問題である。

Krebs (1934)¹⁰⁷⁾に依れば脊椎動物に於けるアムモニアからの尿素合成は第一にアムモニアの除菌にあると考えられる。例えば血液100cc中5mg以上のアムモニアを注射すれば致死量となるが尿素ではその100倍の濃度でも安全であると云われる。第二には、塩基平衡の維持の効果である。アムモニアから尿素を合成することによつて無機態の陰イオンの消費を少くすると云う考え方である。若し尿素合成機能がなければ、塩基の増量に対して乳酸の如き有機酸を以てする外はない。これら合成せられた尿素が生体内に残存せずして排出されることはよく知られるところである。

ところが板鰓類の場合は専らそれが肉中に貯えられる。鮮肉100g中1000mgに及ぶ量は他の動物にみられないところである。従つてその存在理由が普通脊椎動物と同様に解されるか否かは問題がある。

著者は何よりも先ずサメ肉の腐敗経過中その蛋白質が、他の魚種と比較してどのように分解するかを検討した。その結果、サメの場合、腐敗過程に於て蛋白の分解は比較的少いと云うことと、その蛋白の水に対する溶解性が著しく少いと云う新しい事実を見出した。

A) ヨシキリサメ蛋白質の不溶性

実験材料は東京市場より購入した極めて新鮮なヨシキリサメの背中央部の肉である (1949. 11. 9)。この均一な連続部分を10.0g宛の肉片に切り、之を多数のペトリ皿に穿れて蓋を施して25°Cの恒温器中に横置した。これを各経過時間毎にひらいて、時々、肉蛋白質窒素、水溶性全窒素、同蛋白窒素、HgCl₂沈澱窒素、アルコール凝集窒素、pH、肉の揮発性全窒素等の測定を行つた。水浸出は、乳鉢を充分細砕したのを、14~17°Cの室温で1時間行つたものである。

第92表 ヨシキリサメの腐敗経過と水溶性各種形態窒素の変化

放置日数 (25°C)	0	1	2	3
全蛋白質態窒素	2067	2060	2140	2090
水溶性全窒素	995	1102	1249	1076
同蛋白質態窒素	142	279	587	427
同アルコール凝固窒素	204	315	426	337
同HgCl ₂ 沈澱窒素	220*	438	572	565
揮発性塩基窒素	12	66	451	424
pH	5.65	7.10	8.49	8.12

全窒素 3.12%, 水分 76.5%. * 軽度の濁濁程度

198, 199

第92表の結果で特に興味のあるところは全窒素が3.12%で比較的少く、蛋白質態窒素も2.1%前後で他の魚種に比較して（普通は3%前後である）1%少ないことである。即ちサメ肉の蛋白質は意外に少ないものと考えねばならない。

更に注意される点は水溶性窒素中を占める蛋白質態窒素の量が新鮮時に於て極めて少いことが見出される。即ち約14%が水溶性窒素中の蛋白質態窒素である。これを他の魚種と比較すると第93表の如くなる。

第93表 魚種による水溶性全窒素中の蛋白質態窒素の割合比較

	ヨシキリサメ		カツヲ		クロカハカジキ		ビンナガマグロ	
全窒素	3.120	—	4.250	—	3.570	—	—	—
水溶性全窒素	995	100%	1288	100%	1571	100%	938	100%
同蛋白質態窒素	142	14%	706	55%	836	53%	605	61%
揮発性塩基窒素	12		30		24		15	

単位は 100g中のmg数

即ちカツヲその他の普通魚肉の水溶性全窒素中の蛋白質態窒素量は50 - 60%を占めるにも拘らずヨシキリサメでは僅かに14%に過ぎないことはサメ肉蛋白質の特異性を示すものと考えられる。これが腐敗によつて肉質がアルカリ側に傾くにつれて蛋白質の溶出も大となり、第92表から計算すると経過日数に応じて25%、47%、39%と云う値になる。即ち鮮度低下と共に不溶性蛋白質が一部分解するのと（これは恐らく少いであろうが）一種の稀薄アルカリ抽出となるためと考えられる。

第二には全蛋白質態窒素の値のあまり変らないことである。定量は細碎肉を少量の蒸留水（肉3.0g+20cc）と混和して塩化醋酸を加えて沈澱せしめたものの窒素量を測定した試であるが、あまり減少していないのは腐敗によつて分解した程度が軽度であることを示すも

のであろう。然るに一方ではアムモニアは400mg/100gにも達しているのであるから、普通魚種の肉であれば著しい腐敗と解される訳であるが、肉眼的観察の範囲では表面に粘質物を生じた程度で肉そのものは何等融解又は崩壊していない。放置温度にも関係すると思えるが、むしろ弾性を生じていた位である。尿素の定量を行っていないので明かでないがこれらの成績から見ても、細菌が尿素を主に利用して蛋白質を侵していないものと考ええる。即ち清水(1944)¹¹⁰⁾が-1°C前後に貯蔵したヨシキリサメのアムモニア発生に関して100mg/100gを越えても食用に堪えると述べている事は、食用となる可き蛋白質が侵されない以上相当な解釈と云える。又、在来、サメ肉は煉製品工場に於て臭氣、油脂除去のため徹底的な水晒しを行つてのち插漬しているが、このような蛋白質の溶出量の少い魚種に対しては蛋白の損失とはならず、尿素脱離上有効な方法であると思われる。

次に同じヨシキリサメ肉を1%NaCl(Kahlbaum製)液で浸出した場合の各測定値は第94表の如くである。

第94表 ヨシキリサメの腐敗経過と1%NaCl可溶性窒素の変化

放 置 日 数(25°C)	0	1	2	3
全 蛋 白 態 窒 素	2067	2060	2140	2090
1% NaCl 溶 全 窒 素	1174	1162	1354	1298
同 蛋 白 態 窒 素	204	235	396	513
同 アルコール凝固窒素	293	263	330	396
同 HgCl ₂ 沈 澱 窒 素	381	—	550	587
pH	5.60	7.12	8.91	8.21

この結果を見ても新鮮時の溶出窒素量は17%弱で純水の場合と大差はない。腐敗経過に従つて20%、29%、40%と増加するが、この値も一部を除いては純水のそれと大同小異である。従つて、これらの純水可溶性、1%NaCl可溶性窒素から見た蛋白質の溶出量は他の魚種に比較して著しく少量であることが明かである。このようなサメ肉蛋白質の特異性が何に基くかは興味ある問題であつて、多量に含まれる尿素に依る一種の変性現象であるかどうか研究の余地を多く残している。

モウカサメその他小数のサメを除いて一般にサメ肉は煉製品原料として貯蔵中に足の落ち難いものとして知られているが(清水1944)偶々共存する尿素が細菌によつて消費せられる機会が多いために、却つてその蛋白質が腐敗を免かれ、形質を維持し得ると云ふ事実は注目すべきことと思われる。

B) ヨシキリサメ浸出液のHgCl₂沈澱中のN/Hgの値

水浸出液中に蛋白質があまり溶出していない証明として、 HgCl_2 沈澱中の N/Hg の値をしらべてみると第95表の如くなる。この場合の Hg 測定法の既述したと全く同様である。

第95表 ヨシキリサメ肉の腐敗とその浸出液中の HgCl_2 沈澱の N/Hg の変化

放置日数	揮発性塩基窒素 mg/100g	HgCl_2 沈澱窒素 mg/10cc	濾液中の Hg mg	HgCl_2 沈澱物中 Hg mg	N : Hg
0	12	2.198	37.1	12.7	.17
1	66	4.383	29.1	20.7	.21
2	451	5.719	10.5	39.3	.15
3	424	5.646	11.5	38.3	.15

この結果を見ると N/Hg の値が1日後に稍大となつて以後は再び減少して居り、軽度の腐敗で蛋白質が若干溶出したことは此の点からも明かであるが、一般にその値が小さいことに他の魚種と明瞭に区別される点がある。(第43図)

この事は腐敗経過に於て水に溶出して来る窒素形態が低分子のものの多いことを意味して居り上述したように、蛋白窒素が消費されることも少く、又溶出することも少いために、 HgCl_2 と結合する窒素がアムモニアその他の塩基性物質を多く含むことを推定せしめる資料であらう。

従つてサメ肉に就て HgCl_2 に依る蛋白沈澱反応を試みる場合、その沈澱の主体をなすものは、蛋白質以下の低級窒素化合物が多いと見ねばならず、沈澱現象は類似であつても内容が異なる事を知らねばならない。上述したようにサメのアムモニア発生が必ずしも肉蛋白質の腐敗を意味するものでない以上、本反応陽性の故を以て初期腐敗と判定することは妥当でないと考えられる。但し、本反応が陰性の場合には勿論充分新鮮なサメ肉とする点異論はない訳である。

C) ヨシサリサメ肉水浸出液のアルコールによる凝固

他の普通魚種の水浸出液に就て、その水溶性蛋白質の凝固に要するアルコールの最小濃度を求めたと同じ方法を用い、浸出液 1.0 cc に就て無水アルコールによる滴定操作を試みた。試料は上述と同じヨシキリサメ肉である。

第96表 ヨシキリサメ水浸出液中蛋白質のアルコールによる凝固

放 置 日 数	0	1	2	3
濁濁形成に要するアルコール量cc	1.9	1.1	1.4	1.4
同 アルコール濃度 %	65.6	52.5	58.5	58.5
沈澱形成に要するアルコール量cc	10.0以上*	1.8	2.4	2.2
同 アルコール濃度 %	91以上	64.5	70.5	68.8
HgCl_2 沈 澱 反 応	—	+	+	+

* 1 晝夜放置後凝固物を生ずる

この結果によると凝固に要するアルコールの最小濃度はかなり大きく、普通魚種の場合と一致し得ない傾向を示したが、水溶液中の物質が蛋白質に乏しいことが既述の分析結果から明かな以上、寧ろ当然のように考えられる、殊に新鮮時の浸出液で直ちに凝固を生じ難いのは、易溶性の低分子化合物が多いためと解釈される。

同一実験を1%食塩水抽出液に就て行つた結果は第97表の如くであつて解度低下の順序にアルコール濃度が小さくなるのが認められる。

第97表 ヨシキリサメ1% NaCl 浸出液中蛋白質のアルコールに依る凝固

放 置 日 数	0	1	2	3
濁濁形成に要するアルコール量cc	0.6	0.6	0.4	0.4
同 アル コ ー ル 濃 度 %	37.5	37.5	28.6	28.6
沈澱形成に要するアルコール量cc	1.3	0.8	0.6	0.6
同 アル コ ー ル 濃 度 %	56.5	44.5	37.5	37.5

食塩水による浸出液の場合に既に第Ⅲ、3A項で觸れたように純水可溶性蛋白質よりも凝固し易い事実があるから、そのような影響もあるものと考えられる。

2) イカ肉の腐敗と HgCl₂ 沈澱

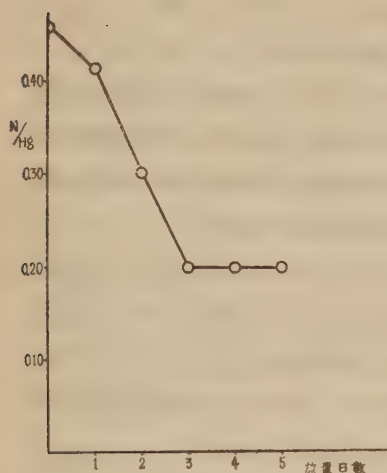
A) イカ肉の腐敗経過と HgCl₂ 沈澱の変化

京京市場購入の新鮮なスルメイカ(凍結品)の胴部肉を5mm 角程度の大きさに細切したもの10.0gをベトリ皿に入れ25°Cの中温器に放置して腐敗せしめ、既述の如く各種形態の窒素の分析を行つた結果は第98表の如くである、本試料の水分73.5%, 全窒素2.77%であつた。

第98表 スルメイカの腐敗経過と水溶性各種形態窒素の変化

放 置 日 数 (25°C)	0	1	2	3	4
大 窒 素 全 窒 素	981	1112	1112	1504	1406
同 量 中 窒 素	326	—	—	—	—
同 HgCl ₂ 沈 澱 窒 素	326	262	262	333	262
揮 発 性 塩 基 窒 素	12	28	133	235	462
水 浸 出 液 中 NH ₃ 窒 素	—	156	335	265	358
水 浸 出 液 中 S 基	?	?	?	?	?
pH	5.45	6.26	7.31	7.98	8.10
Formalin 処理後HgCl ₂ 沈澱窒素	196	—	—	—	—

窒素量は mg/100g で示す



第44図
メヒカリイカの変敗とその浸出液中
の HgCl_2 沈澱中の N/Hg の変化

イカの場合、その水浸出液が HgCl_2 と沈澱を
生じ易いことは、鮮不鮮を通じて変わらないため
に本沈澱反応の適用を困難とするのであるが、
表で見るように、鮮肉の例でその浸出液をFor-
malinで処理したのちも、なお HgCl_2 と沈澱す
る窒素を相当に残している事は甚だ興味がある。
このような現象は他の魚種には見出し得ないと
ころであつて、その未知の基が何であるかは今
後の研究課題である。即ちFormalinで固定し
得ぬ基で HgCl_2 と反応性の高いものが存在して
いる筈である。第98表に於けるSH基の定量は
沃度醋酸法で行い、いづれも反応が陰性に終
つたのであるが、沃度醋酸法では、SH基による

還元後遊離沃度が吸着せられて、沃度反応を與えないために見掛上陰性を示す場合もあり
得るので(Hellerman et al 1941) 92) この点を確かめることと、Formalin処理の効果を
確認するために、同様な実験を補獲条件の明かな試料に就て追試を行つた。

試料は1950年7月10日午前6時、千葉縣館山市附近波左間の大謀網で漁獲された平均
1尾45gの小型のメヒカリイカ(ダルマイカとも俗稱される)を、大型魔法瓶に氷詰とし
て、同日午後2時30分に実験室に搬入して、直ちに実験に移したものである。

試料の水分78.62%全窒素2.98%、還元糖75mg/100g、乳糖85mg/100gである。但し、こ
れの値は、すべて内臓及脚部を除いた胴肉のみの分析成績で、腐敗経過の分析も、同じく
胴肉に就ての値である。

等99表 メヒカリイカの腐敗経過と水溶性各種形態窒素の変化

放 置 日 数 (30°C)	0	1	2	3	4	5
水 溶 性 全 窒 素	1201	1452	1875	1915	1915	1954
同 蛋 白 窒 素	535	647	447	396	329	389
同 HgCl_2 沈 澱 窒 素	606	727	448	336	330	329
揮 発 性 塩 基 窒 素	11.1	178	435	617	539	586
SH 基	49	100	218	274	263	285
pH	6.45	7.90	8.19	8.07	7.55	7.95
Formalin 沈 澱 窒 素	373	593	378	355	237	329
Formalin 沈澱除去後濾液 中 HgCl_2 沈澱窒素	292	208	154	169	161	155

数値はイカ肉100g中のmg数

SH基はシステインとして計算

試料は胴の部分のみを採取し、表面の薄皮（色素斑を有する）を除き、細切して、各10.0g宛をペトリ皿に収め、30°Cの恒温器中に放置した。結果は第99表に示す通りである。

この実験に於ては播漬したイカ肉が極めて高粘性を呈するため、濾紙による濾過が困難であつたから、10g:100ccの水浸出液は遠心後上澄液を集め、これをNo.5Aの濾紙を通してしめたものを使用した。SH基は赤血塩還元法を用い測定した結果、98表の結果と異り明かに陽性を示し、腐敗経過と共に顯著に増大する事実が認められた。

Formalin 処理の効果はスルメイカの場合と異り、Formalin 単用で既に若干の凝固沈澱が認められ、これを濾別した濾液に0.05MHgCl₂を加えて、また沈澱を生じた。全HgCl₂沈澱窒素量を100とした場合のFormalin処理後のHgCl₂沈澱窒素量は48で、スルメイカの場合の60に比較して稍少いが、いづれにしても、Formalin 固定不能の窒素形態でHgCl₂反応性のある物質がイカ肉溶性部分に存在する事は略々確実のようである。

次にモノ沃変醋酸の処理効果であるが、上記のイカ水浸出液10.0ccに0.1Mモノ沃変醋酸2.0ccを加えても、Formalinの場合の如き沈澱は起らず、これに直ちに0.05MHgCl₂を加えると顯著に沈澱を生じたので、モノ沃変醋酸を用いても、HgCl₂反応性の基を封鎖し得ぬことが明かとなつた。

B) HgCl₂沈澱中のN/Hgの値

第99表に掲げた試料に就て、既述の方法でHgCl₂沈澱を除いた濾液中のHgを測定し、沈澱中のNとの比N/Hgを計算すると第100表の如くなる。

第100表 メヒカリイカの腐敗とその浸出液中のHgCl₂沈澱のN/Hgの変化

放 置 日 数	揮発性窒素量 mg. 100g	HgCl ₂ 沈澱率 %, mg. 10CC	濾液中のHg mg	HgCl ₂ 沈澱物 中 Hg mg	N Hg
0	11.1	6.06	36.60	13.22	.46
1	178	7.27	32.30	17.52	.42
2	435	4.48	35.00	14.82	.30
3	617	3.36	33.10	16.72	.20
4	539	3.30	33.40	16.42	.20
5	586	3.29	33.40	16.42	.20

この数値が示す傾向は、他の魚種の場合と異り新鮮時が最も大きい値となつている。この事はイカ肉が、新鮮時に於てもHgCl₂との反応性を多く有する特殊な含窒素物を溶出することを意味する。又、腐敗の進行と共に、N/Hgの値が低減する現象は他の魚種の場合

と同様であり、漸次低分子化合物が HgCl_2 の反応対象となることを推定せしめる。

C) イカ肉水浸出液のアルコールによる凝固

イカ肉水浸出液の HgCl_2 沈澱は、上述の如く新鮮時に既に生成せられるもので、アルコール滴定による凝固沈澱を検討した。試料は A) と同じスルメイカを用い実験法はⅧ, 1項に準じて1.0cc の浸出液を採つて行つた。

第101表 スルメイカ肉水浸出液のアルコールによる濁濁並に凝固

放 置 日 数	0	1	2
濁濁形成時のアルコール量cc	1.0	0.4	0.4
同 アルコール濃度 %	50.0	28.6	28.6
沈澱形成時のアルコール量cc	1.6	0.8	1.0
同 アルコール濃度 %	61.5	44.5	50.0

実験結果は第 101 表の如くであつて、新鮮時には他の魚肉と同様に水和力の強いことが窺われ、鮮度低下と共にそれが弱化するの、イカの場合の鮮度判定にはアルコールによる凝固反応を利用する事が考えられる。

XIII 魚體の部位による腐敗の差異

本沈澱反応を実施する場合に魚体のどの部分から試料採取を行つたらよいかは鮮度判定上一応問題となるところである。然るに在來の腐敗の研究は魚肉の一部を採取して、これをいわば人工的に腐敗せしめている実験が多いので、頭部、腹腔部等が腐敗が速いと云うような事は漠然と考えられているだけで実証の記録に乏しい、僅かに Beatty 及 Gibbons¹¹¹⁾ がタラに就て鰓と血管と筋肉に就ての比較を行つてゐる程度である。そこで著者は鮮魚又は冷凍魚その儘を、自然條件に近い状態で保持して腐敗の進行を検討する必要を感じ二三の実験を試みた。

1) サバに就ての豫備實驗

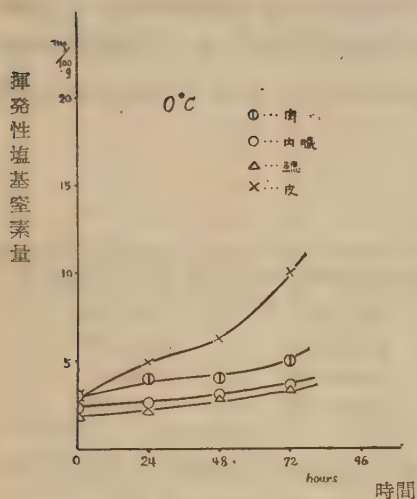
先づ予備實驗として体重500g前後の新鮮なサバ（漁獲後約10時間位）を選び、10尾宛を0°C、5°C、10°Cの室へ放置し24時間毎にその皮膚（全皮膚、頭部を除き肉部の付着せざるようにする）、鰓、内臓（消化管内容物のみを除く全内臓、但し水洗せず）及び肉部の4部分に分つて揮発性塩基窒素の増加状況を¹¹²⁾72時間まで測定した。保藏温度は自記温度計を使用して記録し±1.0°C以上の相違のないように留意した。試験箇所は水産試験場内の冷蔵庫の冷蔵室及びその廊下である。得られた結果は第102表の如くである。

第102表 サバ魚体の放置温度と揮発性塩基窒素の増加

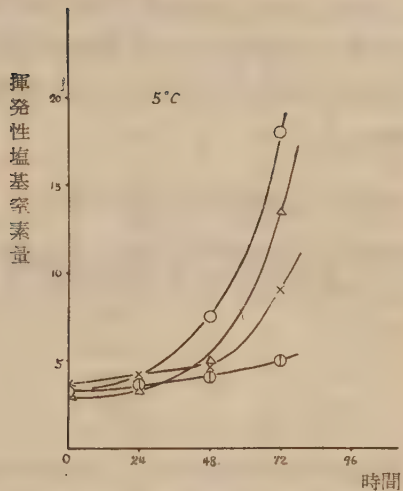
放置温度	0°C				5°C				10°C			
放置時間	肉	内臓	鰓	皮膚	肉	内臓	鰓	皮膚	肉	内臓	鰓	皮膚
0	3.0	2.5	1.8	3.0								
24	3.7	2.7	2.2	5.0	3.5	3.7	2.6	3.9	4.0	12.0	7.8	5.0
48	3.6	3.1	2.6	6.3	3.6	7.5	5.0	4.6	3.7	16.0	10.0	6.9
72	4.0	3.5	3.0	9.8	4.8	18.0	13.0	8.1	11.5	26.0	27.0	17.0

窒素量は mg/100g

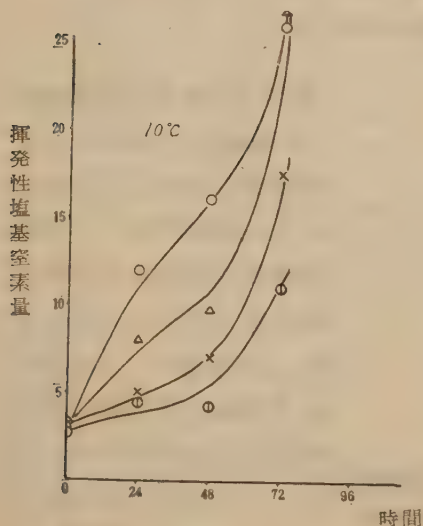
この結果で0°C附近と10°C附近では著しく腐敗状況の異なることが見られる。即ち0°Cでは内臓や鰓の部分と筋肉の部分とは殆ど変化がなく略々同様な状態で、極めて緩徐に増加しているが5°Cになると、内臓と筋肉とは顯著的な相違が認められる。10°Cでは更にその開きが決定的で内臓の分解が急騰することがわかる。これは細菌の汚染が甚しいところから、又細菌の利用し易い低級窒素化合物の多いところから腐敗が進む處で當然予想されるところである。



第 45 図
0°Cに於けるサバ魚体各部の揮発性
塩基窒素の増加



第 46 図
5°Cに於けるサバ魚体の各部の揮
発性塩基窒素の増加



第 47 図
10°Cに於けるサバ魚体各部の揮発
性塩基窒素の増加

特に興味のあるものは0°Cに於ける腐敗で比較的低温であるために外氣に接している部分の皮膚が微量ではあるが、腐敗が先行するのは低温貯蔵の際の腐敗形式のように考えられる。従つて逆に、表面と内部との腐敗の差を見出すことがその魚の経過状態を判定する資料となり得る。

2) 南氷洋冷凍鯨肉の冷凍母船上に於ける 變敗

そこで、1948~1949年の南氷洋捕鯨船団に対して、冷凍母船上の処理條件を種々変えて処理した試料の作製を依頼し、これを保藏温度-10~-15°Cの冷蔵船に輸送せしめたものに就き、内地到着後-15°Cに維持しつつ、捕獲後70日目に

冷凍鯨肉の表面と内部との揮発性塩基窒素量を測定した結果、0°C附近の南氷洋上の処理母船に於ても、僅か10時間前後の間に著しい変化のあることが見出された。

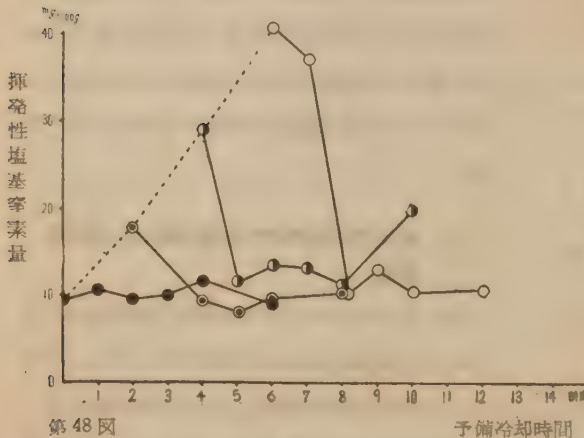
そのうち大洋捕鯨船団作成の試料に就ての分析結果は第103, 104表の如くである。本試料

は1948年12月23日, 18時40分, E 155°34', S 63°45'の概位に於て日新丸船隊によつて捕獲せられたシロナガスクジラで, 捕獲後6時間で解剖開始, 15分間にて終了, 2時間後より船上放冷を行つたものである。肉片の大小 15cm×30cm×20cm とし, 次の如き予備冷却操作を施した。

第103表 南氷洋鯨肉の予備冷却條件

空 気 放 冷 時 間 (-2~0°C)	海水撒布放冷時間 (-2~0°C)	終末肉表面温度	終末肉中心部温度
2	0~6	15~2°C	31~7°C
4	0~6	8.5~1°C	20~2°C
6	0~6	5.0~0.5°C	12~2°C
8	0~6	3.0~1.5°C	6~4°C

空氣中放冷は甲板上であるが, 海水浸漬は船上に設けられた長さ3m, 幅1.5m, 深さ35cmの簡易なプール中で海水を注入しつゝ冷却した。所定時間の冷却後5分を経過し15~16°Cの凍結室に入れ, 40時間の空氣凍結を行つたものである。採用は表面肉(表面下1cm位までを削り取る)と深部肉(表面下5cm)とに分けて行つた。試料の水分77.00~81.00%, 全窒素2.85~3.11%, 粗脂肪1.24~2.06%の赤肉である。



第48図

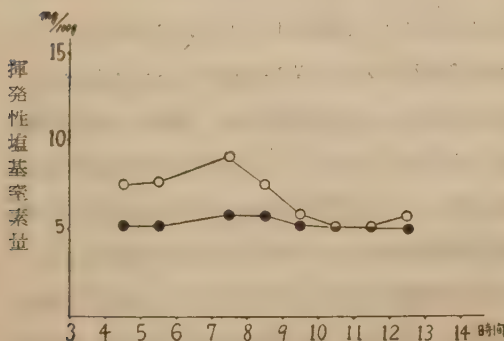
南氷洋ナガスクジラ赤肉の0°C附近に於ける表面肉の揮発性塩基窒素の増加(大洋船団試料)(104表参照)

試料の保管温度は凍結処理後-10°Cを超えていないので, その間の増量はないものと見做して, 以上の結果を見ると, 揮発性塩基窒素は肉深部ではあまり相違が見られないのに表面では著しく差異が認められる事である。環境温度が0°C附近で肉の変敗防止に適當な状況でありながら, 肉中心温度が解剖直後に20°Cもあるためと変敗しやすい血液が多いためとて捕獲後14時間

にして40mg/100gの量に達しているのは, 専ら表面が好氣的に腐敗するからであろう。又海水処理時間の長いものほど表面の揮発性塩基窒素量が少いのは, 一部, 海水で流去されるためと思われる。グリコーゲン, 還元糖, 乳酸を定量した理由は自家消化の進行程度を

第104表 南氷洋冷凍鯨肉の内地到着後の分析結果

空気が放 冷時間 海水冷 却時間	揮 発 性 塩 基 窒 素		深 部 肉 pH	深 部 肉 グリコゲン	深 部 肉 還 元 糖	深 部 肉 乳 酸
	表 面 肉	深 部 肉				
2+0	9.6	7.9	5.8	81	72	645
2+1	10.8	8.6	6.0	83	37	398
2+2	9.8	7.2	5.8	73	97	660
2+3	9.9	10.0	6.2	68	44	438
2+4	11.9	8.6	6.0	83	109	701
2+6	9.1	7.2	5.8	67	81	726
4+0	18.4	9.9	5.8	62	82	830
4+1	13.6	8.8	5.8	50	67	794
4+2	9.5	7.2	5.8	63	84	724
4+3	7.9	8.0	6.2	42	56	507
4+4	9.6	8.3	5.8	69	93	738
4+6	9.3	10.3	5.8	52	69	835
6+0	29.4	10.8	6.2	50	91	715
6+1	11.2	10.8	6.0	35	89	781
6+2	13.1	12.1	6.2	60	94	604
6+3	13.2	12.8	6.0~6.2	23	84	603
6+4	11.2	10.5	5.8	91	111	784
6+6	20.2	10.2	5.8~5.0	45	114	877
8+0	40.5	7.1	6.2	50	174	1107
8+1	37.1	8.2	6.0	28	154	853
8+2	10.1	8.3	6.0	28	132	765
8+3	13.4	9.2	6.0~6.2	38	159	1062
8+4	10.5	7.2	5.8~6.0	43	184	1158
8+6	11.2	10.6	6.0~6.2	38	154	996



第49図 予備冷却時間、南氷洋ナガスクデラ赤肉の0°C附近に於ける表面肉と深部肉の揮発性塩基窒素量の相違
○ 表面肉
● 深部肉 (日本船団試料)

判定するためであるが、捕獲後8時間の経過時間があるために筋肉の解糖作用は相当進行していたものと推定せられる。このような条件下で、鯨肉表面の腐敗が特に進行し易いと云うことは冷凍操作上重要なことのように考察され低温に於ける腐敗が表面にのみ多く見られる好例であると思う。(第48, 49図)

3) 内地に於ける輸送並に冷蔵中の冷凍鯨肉の変敗¹¹³⁾

比較的低温に於ける変敗の例と対比

して、内地到着後輸送中、或は又市場に於ける拒否のため、止むを得ず再凍結を行つた南氷洋鯨肉の分析を行う機会を得た。これらの試料は1949年8月、貨車輸送或は市場での積卸し、展示等を除いては概ね -15°C 前後の保藏温度に終始したのであるが、気温放置の時間の長短によつては、腐敗が進行するにつれて漸次表面肉と深部肉との揮発性塩基窒素の差を失ひ、変敗が平均化する傾向が認められた。

第105表 輸送中並に冷蔵中の冷凍鯨肉の変敗

荷口番号	冷凍魚検査員 判定品位	揮 発 性 塩 基 窒 素			pH (蛋白沈澱反応)	
		表 面	表面下 5mm	中心部	表面(1cm下まで)	中 心 部
1	上	52	37	14	5.6 (—)	5.4 (—)
	中	43	29		5.6~5.8 (—)	5.4 (—)
	下	56	27		5.4~5.6 (—)	5.4 (—)
2	上	37	19	13	5.6 (—)	5.4 (—)
	中	23	11		5.6 (—)	5.4 (—)
	下	49	55		6.2 (+)	5.4 (—)
3	上	35	19	11	6.0 (—)	5.4~5.6 (—)
	中	25	20		6.0 (—)	5.8 (—)
	下	64	50		5.8~6.0 (—)	5.4 (—)
4	上	26	16	7	6.6 (+)	6.6 (+)
	中	33	26		5.4 (—)	5.4 (—)
	下	23	16		5.4 (—)	6.0 (—)
5	上	54	39	22	5.6 (—)	5.4 (—)
	中	25	17		6.0 (—)	5.4 (—)
	下	37	29		5.4 (—)	5.4 (—)

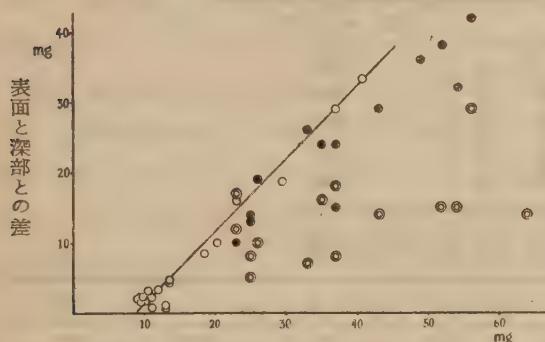
数値は100g中のmg数で示す。

114, 115)
このように試料の部位によつて変敗の程度の異なることは鮮度判定の際の試料採取上、充分注意を要するところであり、逆に又各部の変敗程度の差が著しければ、それに基づいて、或る程度まで保存条件をも類推出來ると考えられる。即ち筋肉部分も、内臓その他と相違のない程度に変敗して居れば、貯藏条件が一定であつたとしても、相当長時間を経たものと見なくてはならないが、若し筋肉の部分に於て、それ程変敗が進んでいなければ、保存条件が比較的良好であつたか、または時間的経過の短いものと推定出來ると考えられる。

即ち、魚体各部の揮発性塩基窒素なり、蛋白沈澱反応等に、あまり差のない場合は高温保持の結果の腐敗であり、各部に差のある場合、殊に表面肉と深部肉とに差のある場合は低温保持型の腐敗経過と推察し得るのである。

低温型の腐敗を検定する試みとして揮発性塩基窒素量の肉表面と中心部との差をとる方法が考えられる。即ち上述した通り、低温型では表面のみの分解が進むから、当然この差

の値は表面の揮発性塩基窒素量に比例する。



第50図 表面の揮発性塩基窒素量
南氷洋冷凍鯨肉の表面と深部との揮発性塩基窒素量
との差と、表面揮発性塩基窒素量との関係
○ 貯蔵条件良好
● 貯蔵条件不良

第104表の比較的保藏条件の良好のものの表面のその量と、中心部との差の値を図示すると第50図の○印を連ねた直線となる。これに保藏条件の悪い試料(第105表)の表面と中心部との差をとると●印の如くなり、先づ、同じ直線の附近に分散する。ところが同じ第105表から表面と表面下5mmの部分の量の差をとると◎印の如くなり、甚しく基準の直線からはずれて来る事がわかる。

即ち、その差の値が表面の揮発性塩基窒素量の増加に比例しないものがずれる訳でありこれはその部分にまで腐敗が均等化したことを示す。従つて、このような製品は同一保存期間であれば、保藏温度の高い、いわば高温型の腐敗が多く関係していることを意味することとなり、冷凍魚類の鮮度管理の一方法として役立つものと考える。

XIV HgCl_2 以外の金属鹽の使用

変敗魚肉の水溶性蛋白質に対して、 HgCl_2 以外の金属鹽にも類似反応の存在する事実は既に述べたが(Ⅷ, 2, D)新鮮度判定を実施する場合、昇汞試薬がその毒性のために食品検査上望ましくないことも一応考えられるので、硫酸銅及び塩化銅を使用した場合の観察を試みたが沈澱反応が少々昇汞に比べて鈍いことが認められた。(第106表)

かなり変敗に達したカツヲ肉(揮発性塩基窒素119mg/100g)を使用し、このものの10.0gを既述の方法に従い100ccの蒸留水に浸出1時間(22°Cを)行い、この濾液各10.0cc中の1%銅塩と沈澱する窒素量を定量した結果は第106表の如くである。即ち、 HgCl_2 に比して沈澱窒素量の少いことが認められた。

この結果をなお確かめるために、腐敗経過に応じて、硫酸銅沈澱窒素量を測定した結果は第107表の如くである。試料は東京市場より購入したカツヲ肉を用いた。

第 106 表 カツヲ肉浸出液中の銅塩沈澱窒素

	N量 mg/100g
水 溶 性 全 窒 素	1586
HgCl ₂ 沈 澱 窒 素	906
CuSO ₄ 沈 澱 窒 素	679
CuCl ₂ 沈 澱 窒 素	527
CCl ₃ COOH 沈 澱 窒 素	792

第 107 表 カツヲ肉の変敗とCuSO₄ 沈澱及び HgCl₂沈澱の比較

放 置 日 数	0	1	2	3	4
水 溶 性 全 窒 素	1640	1640	1580	2195	2200
同三塩化醋酸沈澱窒素	750	800	596	560	760
HgCl ₂ 沈 澱 窒 素	200	550	540	550	800
CuSO ₄ 沈 澱 窒 素	175	60	175	190	305
揮 発 性 塩 基 窒 素	24.9	32.4	42.3	71.8	126
HgCl ₂ 沈 澱 反 応	—	±	+	+	+
醋酸々性 HgCl ₂ 沈澱反応	—	—	+	+	+
CuSO ₄ 沈 澱 反 応	—	—	+	+	+
pH	5.4	5.4	5.6	5.8	6.2~6.4
室 温 C	26~28	26.5	29	30	28~30

100g 中の mg 数で示す。

茲で沈澱反応を検したのは、各々 3.0cc の試薬に浸出濾液 2~3 滴を滴下して観察した結果であるが、CuSO₄の方がやはり反応が鋭敏でない。又、沈澱窒素量も腐敗経過を通じて少いことが認められる。しかし、沈澱形成の様相は判定に困難な程ではないから、HgCl₂ 溶液に代えて、比較的毒性の少い銅塩の 1%液を使用することも考えられる。

XV 本沈澱反應の加熱肉に對する應用

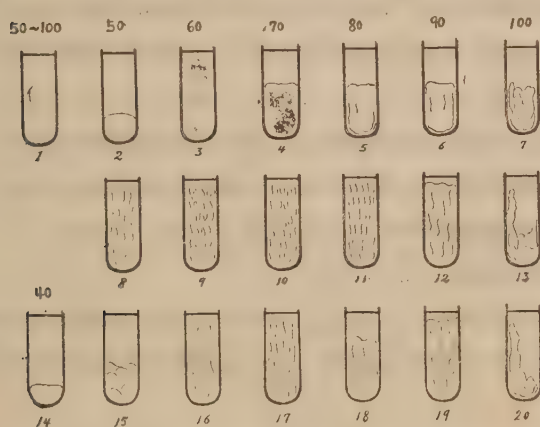
1) 魚肉水浸出液中の蛋白の加熱に依る凝固現象に就いて

A) 鮮度低下のビンナガマグロ浸出液の蛋白凝固像

生魚肉の鮮度低下は水溶性蛋白の熱凝固の程度によつても推定出来る。それは、たと魚肉を蒸溜水で浸出して、その濾液を加熱することにより生ずる凝固の様相を観察するだけ

で足りる。その一例を次に示す。試料は1948年7月6日東京魚市場に水揚げされたビンナガマグロ（約6貫）で、小笠原南方海域で延縄漁法に依り漁獲されたものである。（丸高丸漁獲物）。

試料液の調製は血合を含まない細碎肉 50g を蒸留水 500cc で浸出 1 時間（29.8°C 室温）を行い、後東洋濾紙 5A で濾過し、この濾液各 10.0c.c を径 15mm 内容約 30c.c の普通試験管に分取し、40°C 乃至 100°C の各温度で夫々 10 分間加熱を行つたのである。加熱装置は 1 立容の大型ビーカーに攪拌器を付け、同時に試験管 3 本宛を加熱し、その中の 1 本は普通水銀寒暖計を試験管内に挿入して、その示度が所要温度に達してから加熱時間を測る。熱源は瓦斯で、マイクロバーナーを適宜使用して温度調節をしているから 1°C 前後の誤差は免れ得ない。加熱中は試験管を一定位置に静置して、振盪や攪拌を行わず、時間の推移と共に



第51図 ビンナガマグロの鮮度低下に伴う水溶性蛋白の熱凝固像
上図に於て、50~100. 50. 60. 70. 80. 90. 100は夫々加熱温度（°C）を示す。1は第1日新鮮時の50~100°Cで加熱を行い、凝固の認められなかつた例を示す。2乃至7は第2日の凝固像、8~13は第3日の凝固像を示す。14乃至20は第1日の新鮮肉を1%NaClで浸出した液の凝固像を示す。

々の凝固像を形づくる。即ち鮮度低下と共に蛋白の安定度が崩れていることが推測される。図中 2 乃至 4 は便直上点を連ねて図示してあるが、その凝固物の様相は丁度絹漉豆腐のような滑らかな均質な凝固物であつて、網狀の凝固像を示さないものである。それが 80° 乃至 100°C（図中 5 乃至 7）に及ぶと、漸次液と分離して、均質な凝固物から水が脱けて塊るようになる。凝固物自身が収縮するようになるのである。

それが、第 3 日になると、図中 8 乃至 11 に示すように、50°C 位の低温でも、第 2 日に見られたような均質な凝固物は得られず、凝固物自身が網狀に連絡し合つて、その網の中に

絶えず変化を観察する。

このような方法で、水浸出液中の凝固像を観察した結果は第 51 図の如くなる。これで興味のあることは、第 1 日の水浸出液（図中 1）では 100°C まで温度を高めても殆ど認め得べき凝固を作らないということである。但し、若干の濁濁は生ずる（その程度に就ては後述）。とこ

ろが、第 2 日以後になると、50°C に於て既に若干の凝固沈澱を生じ、加熱温度に応じて様

は勿論凝固物を含むが、一応網状の凝固組織を作ることが観取される。12, 13は90, 100°Cでそのような網状凝固物が更に収縮した形をとつたものである。この場合勿論加熱時間を10分に限定しているから、第2日程度の鮮度低下でも網状凝固物が出来ないのは或は加熱時間が短かいたためで、更に延長すれば異つて来るかも知れない。然し一応、均質な凝固物が先行して、その後に鮮度低下に従つて、網状凝固物が現れるようになると思つても大過ないであろう。更に少しく大膽に想定するならば、鮮肉の蛋白で水溶性のものは、比較的球状若くは楕円状をとるものが多いのに、不鮮肉のそれでは球状等の蛋白が解展することによつて鎖状のものの割合が多くなり、それらが相互に接觸凝固する際には必然的に網状の形式をとらざるを得ないのではあるまいか。その推定の一根據として14乃至20の凝固像をしらべることにする。これは第1日の新鮮試料を水浸出の場合と同様10倍量の割合で、1%NaClを用いて浸出した濾液の凝固像である。これを見ると試料そのものは新鮮であつても少許の中性塩が所在した液中に浸出した蛋白は加熱温度に応じて不鮮肉と同様な網状凝固像をとることが判る。

この理由は中性塩に溶出する蛋白が所謂ミオシンであつて、その形態が細長形の分子であるために凝固の場合にも紐状乃至網状に連絡し易いのではないかと考えられる。ミオシンが少くとも球状ではないことは、流動複屈折の存在の実証によつて明かであるから、このような臆測も甚しく無理であるとは云えないように思う。

いづれにしても、極めて新鮮な魚肉の浸出液と、不鮮化したそれとは、熱凝固の様相が明らかに相違するのであるからこのような簡単な実験によつても鮮度の分別は可能な訳である。

また以上のような結果から、ハニカムの形成に就ても一の推測が下せるのではないかとと思う。ハニカムの定義は確かではないが、要するに、一旦水に溶けた（又は溶ける可き）蛋白が蒸発の際、鮭肉の肉層間で凝固し、たまたま急速に高い温度にもたらされた場合などには溶存ガスや水蒸気などの逸散が起り、その痕跡が噴火口状になる現象や或は甚しく鮮度低下の場合では肉層の一部が溶融して、痕に孔を残すような現象を商品鑑定的に呼んでいるものであろう。従つて、上の実験結果から、極めて新鮮な原料肉を選ばなければ少くとも悪質なハニカムは起り難いことが推定されるから、この点からも原料鮭の選び方乃至は不良肉を予め取除くことの重要さが痛感される。

鮭罐詰に見られる豆腐状凝固物¹²¹⁾或はアドヒージョンに就ては松生博士らが研究されたところであるが¹²²⁾、鮭肉が漁場に至近な工場で極めて新鮮原料が肉詰されているからこのような現象を起すのも、その製造工程に於て、生詰をした上に食塩を少量撒つて後脱

氣に程に移るのであるから、中性塩可溶蛋白が凝固するのは何等不思議ではなく、このような方法を実施する限り、豆腐状凝固の生ずるのは寧ろ不可避であるとさえ言い得られる。

B) 新鮮ビンナガマグロ浸出液の蛋白凝固の程度

次に図中1の第1日の浸出液を50乃至100°Cで加熱した場合の観察であるが、沈澱物は生じないが、微かな濁濁の生ずることは上述した通りである。このような濁濁は定量用濾紙をも通過するから、沈澱物として濾別することは出来ないが、その濁濁の程度が加熱温度に応じて増加していることは、比濁測定の結果、明かにすることを得た。この場合、濁濁物中の窒素量等を直接定量することが、上述の理由から不可能であるので、極く稀薄な塩化銀（AgCl）液を別に調製し、図中1に相当する濁濁の程度を便宜上塩化銀の濃度で表わす事としたのである。その結果は第108表の如くなる。なお比濁測定装置は既述の第62図に示すような光電比濁計を山田金次郎氏が製作し、この装置を使用して測定を行つたものである。液層は2cmの角型硝子製セルを使用した。

第108表 新鮮ビンナガマグロ浸出液の加熱に依る濁濁程度

加 熱 温 度	水浸出液の濁濁度 (AgCl量ガンマ/CC)
50	5
60	20
70	28
80	34
90	34
100	41

この結果から、新鮮肉の水浸出液といえども、加熱温度に応じた濁濁の増大を見せていることは明かである。このような現象は不鮮肉浸出液で見られる凝固程度と加熱温度との関係に於ても、本質的には大差なく起り得るであろう。たゞ不鮮肉の場合では、比較的低温度で既に急速な凝固が起るために、上の実験条件では捕捉し得ないに過ぎない。

C) 各加熱温度に於ける鮮度低下のビンナガマグロ浸出液中の凝固蛋白窒素量

次に、上に示した不鮮肉浸出液中の各温度に於ける凝固蛋白量であるが、各温度に於ける凝固物を濾別した濾液中の窒素量をキールダール法で定量を行つた。この場合、水溶性の全窒素量を測定しなかつたために、著者の研究結果^{123,124)}から、仮に鮭肉の10倍水浸出液中の窒素量を100gに就き1000mgとして、これから各測定値を差引いた残りを凝固

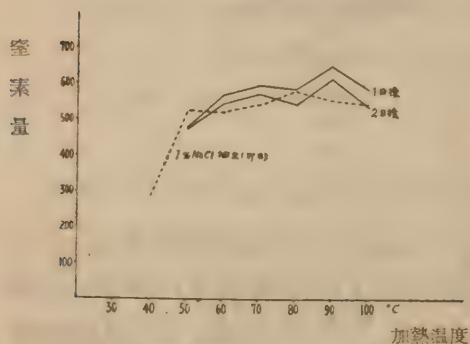
蛋白窒素量とした。勿論、既述(IV項)のように、水に溶出する全窒素量は、鮮度に依つて相違があるから、第109表の結果からは、逐日の凝固蛋白窒素量の比較は全く行い得ない。たゞ、同日の浸出液中の各温度別の凝固蛋白窒素量だけを比較し得る訳である。

第109表 加熱温度とビンナガマグロ浸出液中の凝固蛋白窒素量

加熱温度℃	水浸出液中の凝固蛋白窒素魚肉100g中mg		1% NaCl 浸出液中の凝固蛋白窒素魚肉 100g 中 mg
	第 2 日	第 3 日	
40	—	—	285
50	480	475	525
60	570	548	520
70	595	570	543
80	585	541	580
90	650	617	555
100	585	534	540

註 第2日は第51図2〜7、第3日は8〜13、1% NaCl 浸出液は14〜20に相当する
(第51図参照)

この結果を図示すると、第52図の如くになり、加熱によつて凝固する蛋白中の窒素量が略々2段階に分れて増加するのが見られる。



第52図 変敗過程のビンナガマグロ浸出液中の凝固蛋白窒素量と加熱温度との関係

即ち、70℃及90℃が夫々の最大点であり、1% NaCl 浸出液の場合は、50℃及び80℃前後である。このような現象は既に清水教授によつて指摘せられたところで、異なる二群の蛋白の存在として説明せられている。又この図で注意される点は、第2、第3日目の凝固蛋白量の最大点が、かなり規則的に一致している事であろう。更に鮮度低下した場合の最大点の変化乃至は移動を調べることも興味ある問題であろう。

2) HgCl_2 沈澱による加熱肉の変敗判定

既述(II項)したように、鮮肉水浸出度中で昇水と沈澱を起す物質は主として蛋白であろうことは判つた。勿論、直接魚肉の水浸出液を使用するのであるから、蛋白以外の物質で結合に関與するものも当然あり得る訳であつて、飽くまで主要なものが蛋白であると

いうに過ぎない。

ところが蒸煮肉の場合は、可溶性蛋白の中で熱凝固する部分は、再び水浸出を行つてもあまり溶けて来ないであろうから、比較的可溶性の含窒素物が金属塩と結合を起す機会が多くなるものと推定される。しかしながら又、一方では加熱を受けた肉でも可溶性の蛋白部分は皆無ではないから、当然沈澱の一部には参加するであろう。先ずはじめに、沈澱反応が鮮肉同様に起り得るか否かについてしらべる。

A) 同じ魚肉を使つて鮮肉と加熱肉との昇汞沈澱反応の比較

はじめに、同一魚体の連続部分を一方は鮮肉のまゝ、他方は100°C20分蒸煮(コツホ釜使用)して、夫々10倍量の蒸溜水(10g:100c.c.)で浸出1時間を行い(室温19~22°C)既述の方法で沈澱反応の生起を観察し、東洋濾紙製試験紙によるpH測定、減壓蒸溜法による揮発性塩基窒素の測定を行つた。

i) サバ

1949年10月3日、東京市場より入手のサバ4尾を用い、肉片とした後、大型ペトリ皿中に容れ、28°Cの恒温槽に放置、連日測定した結果は第110表の如くである。

第110表 サバの変敗経過と鮮肉並に加熱肉との昇汞沈澱反応

試料	放置日数	0 (X.3)	1 (X.4)	2 (X.5)	3 (X.6)
	鮮肉の外観	普通極めて新鮮とは云えない	肉、変色し少しく変敗見	肉、赤味を帯び変敗見	肉、赤褐色となる鈍しい変敗臭
鮮肉	揮発性塩基窒素 mg/100g	13.1	25.9	118	302
	pH	5.6MR	5.8MR	6.6 MR BTB	6.6 BTB
	HgCl ₂ 沈澱反応	—	微濁、振ると透明となる	雲状沈澱振ると濁る	雲状沈澱上澄とすぐわかれる

試料 加熱肉	揮発性塩基窒素 mg/100g	15.6	20.8	137	236
	pH	4.4MR	5.4~5.6MR + 明瞭な沈澱振るとくもる	6.6MR + 雲状沈澱振ると上澄とすぐわかれる	6.8BTB + 第2白(左)と略同じ
	HgCl ₂ 沈澱反応	—	—	—	—
	蒸煮の際滲出した液汁量 (肉10gより)g	1.6	3.7	1.4	1.1
肉	同液中の揮発性塩基窒素量鮮肉100gに換算mg	—	6.3	20.8	28.6

ii) ビンナガマグロ

日本冷蔵より入手せる冷凍ビンナガマグロ(捕獲その他不詳)を1949年10月17日より実

験に供した。採肉位置は血合を含まない脊肉の連続部分で前記同様大型ベトリ皿に収め22°Cの恒温槽に放置した。

第111表 ビンナガマグロの変敗経過と鮮肉並に加熱肉の昇汞沈澱反応

放置日数		0 (X.17)	1 (X.18)	2 (X.19)	3 (X.20)
試料	鮮肉の外観	普通変敗臭なし	大差なし	色変らず種変敗臭	赤味を帯ぶ変敗臭強し
	揮発性塩基窒素 mg/100g	23.0	21.9	37.8	47.3
	pH	5.6MR	5.6MR	5.6MR	5.6~5.8MR
	HgCl ₂ 沈澱反応	-0.3c. c.	-0.3c. c.	+0.3c. c. -0.1c. c.	+0.1c. c.
加熱肉	揮発性塩基窒素 mg 100g	21.7	22.9	24.1	31.8
	P.H.	5.6MR	5.6MR	5.6MR	5.6MR
	HgCl ₂ 沈澱反応	+ 0.3c. c. - 0.1c. c.	+ 0.3c. c. - 0.1c. c.	+ 0.1c. c.	+ 0.1c. c.
	煮沸の際滲出した 液汁量(肉10gより)	2.5	1.7	1.8	1.4
	同液汁中の揮発性 塩基窒素鮮肉100g に換算mg	7.0	5.6	6.9	9.6

第111表から、昇汞による魚肉水浸出液の沈澱反応は、鮮肉及び加熱肉を通じて生起することが確かめられた。サバ、ビンナガマグロを通じて興味ある事実は、加熱肉に現われる反応が同一条件の鮮肉に見られるそれと比較してより鋭敏だということであろう。例えば、サバの例では、1日後の試料で、鮮肉の場合±程度であるのが、加熱肉では明瞭な+となつて反応する。実験は既述の通り、3.0c. c.の約0.05MHgCl₂液に0.1乃至0.3c. c.或は0.3c. c.以上浸出濾液を滴下しているのであるが、ビンナガマグロでは、特に反応出現限界を滴下量を定めて比較した結果、第111表の通り、例えば当日及び1日後の試料で生肉では0.3c. c.で未反応であるものが、加熱肉では同じ0.3c. c.で陽性に現われているのである。(このような相違を起す理由に就ては後述で推定する。)実際の罐詰工場に於て判定を行う場合、鮮肉と加熱肉に就て比較することは実行し易いから、反応にこのような相違の存することは、むしろ有利ではないかと考える。何故ならば、極めて新鮮な肉では加熱肉といえども反応しないのであるから、加熱後に反応陽性になった場合、鮮肉の時に若干鮮度低下を來していたものである事が検定され、以後の肉詰の際の加熱肉の処置に指針を與えることが可能だからである。殊にビンナガマグロの場合、鮮魚の官能性鮮度判定だけでは、良肉を不鮮肉と誤認したり、逆に不鮮肉を合格させるような錯誤が、その漁獲条件、輸送条件等に影響されて起り勝ちだからである。

第111表には、生肉を加熱した際、滴下する液汁量を掲げたが、この数字は勿論全魚体

そのものを異る温度，時間條件で加熱した場合の量と当然異るであろう。また表で知れるように，鮮肉中に所在した揮発性塩基窒素が液汁中に含まれて或程度溶出する事実も見逃せない。但し，大型魚の場合肉層間にこのような形態の窒素が逃去らずに残ることもあり得るから，この液汁中に含まれる揮発性塩基窒素が肉の間に残留するか或は液汁と共に滴下するかによつて沈澱反応出現の鋭敏さに及ぼす影響が考慮せらる可きであろう。

恐らく，肉層間にこの種の窒素が残存すれば沈澱反応が現れ易くなるであろう。

B) 加熱肉滴下液汁並に加熱肉水浸出液に見られる HgCl_2 沈澱物の内容

上の実験結果から，加熱肉浸出液に於ても見掛けの上の沈澱反応は成立ち，鮮肉の場合の反応との比較から，簡易測定の目的には利用出来る見込は得られたが，その沈澱そのものの内容が鮮肉の場合と同じように，蛋白沈澱反応として扱えるかどうかを吟味して見る必要がある。前項に述べたように，水浸出液に溶出する蛋白には熱凝固する部分が多いから，鮮肉を当初から加熱した場合には，これら熱凝固性蛋白は加熱肉中に留まるため，加熱肉をあらためて浸出しても，比較的溶出する蛋白は少くなる筈である。実験結果は予測の通りであつて第 112 表に示すような傾向が認められた。

試料は 1949 年 8 月 10 日，東京市場より入手したカツヲ(雄)約 4.4kg の血合を除いた脊肉部より採取した肉片を大型ペトリ皿に容れ，室温 ($29^{\circ}\sim 31^{\circ}\text{C}$) に放置し，連日鮮肉の揮発性塩基窒素量，pH，昇汞沈澱反応，加熱肉の水浸出液濾液中の全窒素，蛋白態窒素(三塩化醋酸沈澱による)， HgCl_2 沈澱態窒素量を測定した。

第 112 表 カツヲの変敗経過とその加熱肉水浸出液中の窒素分布変化

放 置 日 数	0 (VIII. 10)	1 (VIII. 11)	2 (VIII. 12)	3 (VIII. 13)
浸出液中の全窒素(鮮肉100g中mg)	72.1	78.9	120.3	137.5
同上蛋白態窒素 mg/100g	17.8	13.2	20.1	27.8
HgCl_2 沈 澱 窒 素 mg/100g	24.6	19.5	40.9	54.9
蒸 煮 の 際 滲 出 し た 液 汁 量 肉10gより	1.2	1.9	0.95	1.1
鮮肉100g中の揮発性塩基窒素 mg	17.4	24.9	63.1	102.0
鮮 肉 の 昇 汞 沈 澱 反 応	±	+	+	+
鮮 肉 の pH	5.6 (MR)	5.4 (MR)	5.8 (MR)	6.4 ($\begin{smallmatrix} \text{MR} \\ \text{BTB} \end{smallmatrix}$)

第 113 表 カツヲの変敗経過とその加熱肉より滴下した液汁中の窒素分布変化

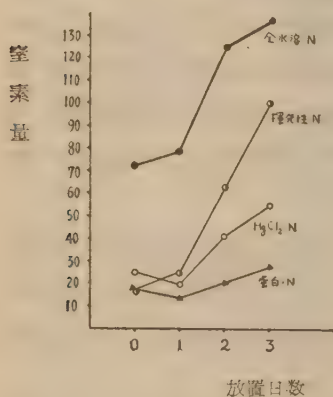
(液汁10g中のNをmgで示す)

放 置 日 数	0	1	2	3
液 汁 中 全 窒 素	13.3	14.8	25.2	26.7
同 蛋 白 態 窒 素	5.6	4.9	11.8	11.1
HgCl ₂ 沈 澱 窒 素	8.4	8.0	16.4	20.2
蒸 煮 の 際 滲 出 し た 液 汁 量 肉10gより	1.2	1.9	0.95	1.1

第114表 カツヲの変敗経過とその加熱肉より滴下した液汁中の窒素分布変化

(鮮肉100g 中の mg に換算したもの)

放 置 日 数	0	1	2	3
液 汁 中 全 窒 素	15.9	27.8	23.9	28.0
同 蛋 白 態 窒 素	6.7	9.2	11.2	11.7
HgCl ₂ 沈 澱 窒 素	10.1	15.1	15.6	21.2



第53図 カツヲの変敗過程とその加熱肉水浸出液中の窒素分布変化

第113, 114表を図示したものが第53図であるが、これらの数値、曲線等から、先ず注意されることは、加熱肉浸出液、加熱肉より滴下する液汁中の窒素を含めて全窒素量が鮮肉100g中たかだか160mg程度で、鮮肉を直接水浸出した際の数値の約1/10に過ぎないことである。これは、要するに非凝固性(熱による)窒素量が示される訳であるから、当然予測されることである。次に、重要なのはこの窒素中にも三塩化醋酸で沈澱せしめられる部分がかなり残存していることである。その

割合を計算してみると第115, 116表の如くなる。

第115表 カツヲ加熱肉浸出液中の全窒素に対する蛋白態窒素及びHgCl₂沈澱窒素の比(%)

放 置 日 数	0	1	2	3
蛋 白 窒 素 / 全 窒 素	25	17	17	20
HgCl ₂ 沈 澱 窒 素 / 全 窒 素	34	25	34	40

第116表 カツヲ加熱肉より滴下した液汁中の全窒素に対する蛋白態窒素及びHgCl₂沈澱窒素の比(%)

放 置 日 数	0	1	2	3
蛋 白 窒 素 / 全 窒 素	42	33	47	42
HgCl ₂ 沈 澱 窒 素 / 全 窒 素	63	54	65	76

この百分率を見ると腐敗の進行と共に全窒素中を占める蛋白態窒素の比があまり変らない。図からも明かなように、可溶性全窒素の増加につれて可溶性蛋白窒素も増加している訳であつて、 HgCl_2 に落ちる窒素も略々同様であるのは、加熱肉の場合でも蛋白が固定せられてゐることが推定される。たゞ、鮮肉の場合と異なるのは、三塩化醋酸で落ちる窒素よりよほど量が多い点に相違がある。この差異に相当する窒素は加熱肉の場合では確定してゐないが恐らく、アンモニア以外に一部三塩化醋酸で固定し得ないプロテオース級のものが含まれてゐるのではないかと思う。はじめの予想では加熱によつて魚肉は若干のアンモニア増加をするから、加熱肉浸出液の場合では、 HgCl_2 との結合物にアンモニアが寧ろ主体となるのではないかと考えたが、以上の実験結果からは、そのような具体的事実は得られないようである。たとえば、第112表の放置3日後の試料に就て見れば、鮮肉100g中に揮発性塩基窒素が約100mgあるのに、浸出液中全窒素は約138mgに過ぎない。この中 HgCl_2 沈澱窒素は約55mgであるから、この窒素を全部アンモニアで構成させるとしても加熱によつて50mg近くのアンモニアが加熱で揮散してしまう事を仮定せねばならない。加熱によつてアンモニアが揮散する割合は腐敗が進むにつれて、その濃度増加と共に大きなるとも考えられるが、第110、111表の例から引用して計算すると第117表の如くなる。

第117表 加熱の際揮散する揮発性塩基窒素量の推定 mg/100g

測定項目 \ 試料	カツヲ		ビンナガマグロ	
1. 鮮肉中の揮発性塩基窒素量	118	302	37.8	47.3
2. 加熱肉中の揮発性塩基窒素量	137	236	24.1	31.8
3. 滴下液汁中の揮発性塩基窒素量	20.8	28.6	6.9	9.6
推定揮散量(1)-(2+3)	-39.8	37.4	6.8	5.9

試料が必ずしも均一に腐敗した部分について実験されていない例もあるので、推定揮散量がマイナスに出る点もあるが、この表から見た範囲では20%を超えるものはない。従つて50%も加熱によつてアンモニアが揮散することはあり得ないのではないかと思われる。IIの項に述べたように沈澱物の内容を單一なものとして規定することは勿論困難ではあるが、以上の諸考察からして、加熱肉浸出液に就ても、 HgCl_2 と沈澱するものは主として蛋白であるとして、差支えないように考える。

以上の結果から、本沈澱反応が加熱肉の変敗判定にも利用し得ることがわかる。又、魚肉浸出液を一定温度で、加熱する際生ずる蛋白凝固現象によつても、鮮度低下の程度を判定する事も可能であろう。

同一程度の鮮度低下魚肉では、鮮肉よりも加熱肉に就ての水浸出液がより鋭敏に HgCl_2 、

との沈澱反応を示すことを認めたが、罐詰原料肉の判定上、有利な事実であると思う。

この結果から見れば、加熱肉水浸出液と HgCl_2 との沈澱物の内容は、やはり鮮肉に於けると同じように、蛋白が主体をなすものと考えられる。

XVI 總 括 並 に 討 議

獣肉水浸出液と HgCl_2 とが、その新鮮度に応じて沈澱現象を起す事は W. Wałkiewicz の既に記載したところであるが、此の方法がその後何等の発展を見なかつた理由の一は、本沈澱形成の機構及び若干の例外的現象（例えば新鮮肉でも pH 6.2 以上の肉に於ける沈澱形成等）に就ての正当な解釈が何等行われず、唯事実の紹介にのみ終つたためであると思われる。

著者は W. Wałkiewicz, G. Busch, H. Keller 及 H. Möller の既往の研究者が全く觸れなかつた本反応生起の機構を魚肉の腐敗との關聯に於て明かにし、これがその新鮮度判定への利用性を検討して、腐敗による蛋白質の分解を、分解生産物の側からではなくして蛋白質自身の HgCl_2 に対する行動の変化から考察して一新知見を加え得たと信ずる。

新鮮肉の水浸出液では何故に HgCl_2 と沈澱を生ぜず、腐敗肉の場合は形成するかを知るためには先づ沈澱の主体をなす物質が何であるかを明かにせねばならない。 HgCl_2 と結合し得るものとして魚肉浸出液中に溶出するものは蛋白質以外にもアムモニア、塩基性アミノ酸群が考えられる。アムモニアは HgCl_2 と結合して $\text{Hg}(\text{NH}_3)\text{Cl}$ を形成するものであるが、このものが本反応の主体でないことは、 HgCl_2 と沈澱を生ずるには不足な程度にしかアムモニア生成量が認められないような魚肉浸出液でも、明瞭な沈澱を與えられることで容易に理解される（Ⅱ.1）。勿論、腐敗が進行すれば、アムモニアの参加も当然考えられるが、少なくともアムモニア 30mg/100g 程度の初期腐敗では主体とは云えないのである。

又、塩基性アミノ酸群も浸出液中の反応としては必ずしも HgCl_2 で沈澱せしめられるとは限らない。その理由としては、除蛋白処理後の浸出液で HgCl_2 が沈澱を生じない事実、又沈澱反応を與えるような浸出液で HgCl_2 沈澱を除いたのちの濾液中に、燐タングステン酸の如き塩基性アミノ酸沈澱剤に落ちる窒素を多く保有しているからである。しかもその量が三塩化醋酸の如き除蛋白剤で処理後の P. W. S. 沈澱窒素量と殆ど相似であることは、 HgCl_2 が蛋白沈澱剤として行動している事を示すもので、少なくとも初期腐敗時の本沈澱内

容は蛋白質が主体であると見て差支えない。魚肉の放置條件を脱酸素状態として、腐敗せしめても、この傾向は同様である。

然し乍ら、これはあくまで初期腐敗に¹⁵⁾於ける HgCl_2 の相手が蛋白質が主であると云うことだけであつて、新鮮時並に特に甚しい腐敗時には、他の低分子化合物の結合も考えねばならない訳である。新鮮時の浸出液では沈澱現象は全く起らないが、 HgCl_2 添加後長時間放置して観察すると、軽微の不透明化が起る。このような濁濁物を濾過しても、殆ど濾紙を通過するが、なお濾紙上に残留せしめ得る部分に就て調べてみると、その中の N/Hg の値が、既に明瞭な沈澱物を形成する初期腐敗時の沈澱中の N/Hg より低い値をとる事がわかる。

この値がより小さいと云う事は沈澱に参加する物質が蛋白質よりも低分子のものである事を意味する。何故ならば高分子の蛋白質は内部に多くの作用基を有しながらも、それらは複雑な内部構成のために參與して、直接反応系に露出して外部と反応する事が少ないのであるから、結合した單位量の Hg に比較して N の含有量が当然多くなくてはならないからである。従つて、逆に鮮度低下の著しい魚肉浸出液で N/Hg の値が小さいのも、蛋白質分子の腐敗によつて低分子化する以上当然期待せられる訳であり、事實はまたその通りである(XI)。但し、腐敗の進んだ場合の N/Hg の値の小さい理由には、アミノアの如きものが増加している爲に、全体としては蛋白の如き高分子とアミノアの如き低級化合物との中間の位置を占めるような見掛け上の N/Hg の値を與える事も考えねばならないであらう。

問題は全般的に N/Hg の値が比較的小さい点で、 $\text{Hg}(\text{NH}_3)\text{Cl}$ の場合の0.07の8倍程度しかならぬ事であるが、その理由は HgCl_2 の結合する基が多種に亘るであろうことと、又同一の結合基にしても Hg 1原子あたりの基の数が多いこととによるものと思われる。例えばビユーレット反応に於ては Cu 1原子に対して、ペプチド N 4個が結合するような想定^{126, 127)}も行われている。

要約すれば、当初は沈澱をこそ生じないが HgCl_2 と結合するような若干の低分子化合物の反応があり、初期腐敗では専ら蛋白質が沈澱の主体をなし、腐敗後期に及んで蛋白質以外の低分子化合物、アミノア等が沈澱に参加すると云う経過が最も妥当な解釈であると思われる。従つて、 HgCl_2 沈澱物の内容は実質的に腐敗経過に於ける含窒素化合物の変化と密接に結びついていると考える事が出来、本反応を魚肉の新鮮度判定に利用する根據が成立し得ると信ずる。

沈澱内容物が單純に、ある特定の物質であると限定し得ない事は複雑な内容物を持つ魚

肉の水浸出液を扱う以上当然な訳であるが、一応、初期腐敗時の反応生成物に蛋白が多いとすると、その水に対する溶出条件の吟味が必要である。特に簡易測定法としては反応に與る物質の溶出に時間を要するようであつては不利な訳であるが検討の結果(Ⅲ)、時間的には30分前後で殆ど溶出の完了する事が認められる。また原肉に対する抽出用の水の量を調べたところ、その量と関係なく、同一条件の肉からは常に同一量の含窒素物の溶出が認められた(Ⅲ)。^{128, 131)}但し平野(1942)に依れば魚肉蛋白質の中性塩(KCl, LiCl)抽出に、掃蕩抽出なる語を用い、蛋白の完全抽出の困難性を論じて居り、著者の場合の純水抽出とは若干異なるが、著者の例には平野の述べる見掛け上の平衡に相当するものと思われる。しかし、同一魚肉を一度水抽出を行つたのち、更に新たな水を加えて浸出した液に就て痕跡程度の窒素を認めるに過ぎないので、鮮度判定の実際操作に於ては、反応に関係する物質の溶出は充分であると考えられる。

又、変敗過程に在る魚肉より溶出する窒素量に相違の見られる点も注意される。即ち、新鮮時の魚肉と変敗時のそれでは、同一の連続部分の筋肉を使用しても明らかに溶出窒素量が異なるのである(Ⅶ)。魚肉の中性塩抽出蛋白質に就てこの現象は清水氏、平野氏によつて夫々独立に指摘せられ、清水⁷⁹⁾⁸²⁾はこれを一種の酵素作用と見做し、平野¹³¹⁾はこれを液底体律によつて説明し得るコロイド現象であるとした。著者の実験では水溶性全窒素の減少は明かに溶出蛋白質窒素量に関係しているから、窒素溶出の増減が蛋白質の溶解性如何に依存することは確かと考えられる。

そこで蛋白質の溶出減少に酵素作用が関係するかどうかを検定する試みとして、常溫に防腐條件で2週間放置した鯨肉に就てそれ以後防腐劑を揮散させ、腐敗せしめたところ、この肉でも明らかに溶出窒素量の減少が認められた。従つて、酵素作用の進行が充分行われた以後に於ける溶出窒素の減少は寧ろ腐敗に隨伴して起る現象と考えざるを得ない。蛋白質の溶解に関與する因子は極めて複雑であらうが、蛋白質自身の側から考えれば、その形状、表面に所在する極性基、非極性基の割合、或は側鎖が存在すればその種類、末端基の性質等が影響し、溶媒から見れば極性の有無、その有するpH、中性塩溶液の場合は塩の種類濃度等に当然支配せられるものと思う。

蛋白質の腐敗と共に非極性基の出現する機会が多い訳であり、著者の実験では、水浸出液中蛋白質のアルコールによる凝固が、腐敗と共に、より低濃度のアルコールで生ずる事が明かとなり、これは恐らく蛋白質の水和力低下が非極性基の出現に基いて起つたものと推定している。水に溶出した部分の蛋白質に於ても、水和性が減少している訳であるから不溶の状態で残存したものでは更に非極性基の出現が多いのではなからうかと考えられる。

又鮮肉に就て稀薄アルカリ及び稀薄中性塩液で抽出を試みると、溶出窒素量は必ずしも pH の上昇又は塩類濃度の増加に比例しない。これは寧ろ当然のことで、構成蛋白質の中でその有する等電点如何によつては溶出の妨げられる事もあり、又塩類濃度によつては塩析を起す事もあり得る訳である (Ⅵ.2,3)。

魚肉の水浸出を行うに当り、蒸溜水を用いても肉中の塩基性物質によつては pH の移動を、無機塩類の溶出によつては一種の稀薄塩類抽出を行うと同様な効果を與えることになるであろう。従つて、これらアルカリ又は塩類の濃度如何によつては溶出蛋白質量の減少又は増加を生ずる事は自然であろう。

著者は腐敗と共に溶出する水溶性磷酸及び溶出全灰分を測定したが、これらの物質には何ら溶出減少点が見出せなかつた。即ち是ら無機成分が一方の増加或は緩徐な増加を示すに過ぎないにも拘らず、液中に溶出する窒素量には明らかな異同が認められる。無機成分が溶出含窒素物に含まれているものであれば、窒素量と増減を一致する筈であるが、事實は之に反する。この事は溶出に際して遊離の無機塩類が稀薄溶液を形成し、その條件に応じた含窒素物の溶出を促すものと解される。勿論、腐敗が進行すれば、低分子の易溶性窒素化合物が増加するのであるから、腐敗後期に至るまで同一條件が溶出を支配するとは云えないが、腐敗初期にあつては、蛋白の溶出を阻む少くとも一つの理由になるであろう。即ち魚肉の変質に際して起るその蛋白質の水に対する不溶性には、在來述べられているような酵素の影響以外に、魚肉の pH の変動並に無機成分の所在をも考慮すべきであると考ええる。

稀薄アルカリ、稀薄中性塩類浸出による魚肉蛋白質は容易に HgCl_2 と沈澱を形成する。このような條件で溶出せる蛋白質は所謂ミオン様のもので解される。稀薄アルカリの場合では N/100 NaOH の濃度に於てすら、その浸出液中に遊離アミノ酸窒素が増加する事から見て軽度の加水分解を生じたものと認められるから、蛋白質分子表面に活性基の増加も伴う筈であり、従つて HgCl_2 との反応性も高まる訳であろう。中性塩抽出の場合も又ミオン系蛋白であるが、このものが何故 HgCl_2 とよく反応するかは、恐らくその分子形状が棒状或は鎖状である事から、より多く作用基が露出するために、反応性が増すのではないかと考える。

Szent-Gyorgyi¹⁰¹⁾の近業によつても生体内の筋肉ミオン、アクチン、アデノシン 3 磷酸の離合集散がその系内の Mg その他のイオンによつて、しかもその極めて微量の範囲の増減によつて、形態の変化する事実が明かにせられているので上記の如き想像も可能であらうと思う。

塩類可溶性蛋白質では既述のように HgCl_2 との反応性が顯著であるが、純水可溶性蛋白質でも腐敗によつて、その構造が変化するに至つて、容易に反応性を示すようになる(V.5)。しかも、そのような際、浸出液 pH の大きな変化を必要としない。即ち、沈澱反応を與えなかつた新鮮時とあまり相違のない pH でも、反応性が高まる。この事實は蛋白分子の持つ電荷の正負による沈澱形成以外にも本反応に関係する他の因子のある事を意味する。それは蛋白分子の開裂によつて活性化する作用基の出現である。純水可溶性蛋白の腐敗による HgCl_2 沈澱形成の例としてはまたゼラチンを挙げる事が出来る (V.6)。

蛋白質分子の有する電荷の正負が沈澱現象の主要な機会となるか如何は甚だ重要であるがこのような説明は古くから採用せられ蛋白分子の化学量論的な反応に際して、しばしば論ぜられた。Michael の実験によると陰イオン錯塩、陽イオン錯塩を用いて明瞭にこの事實を証明している。即ち純粹に精製せられた蛋白については錯塩による沈澱が蛋白の荷電の正負によつて行われることが認められた。しかし、このような現象は蛋白質並に沈澱を生ぜしめる試劑との相互の性質を見極めた上でなければ、常に適用し得る理由とはならない。著者の実験では、先づ極めて新鮮な魚肉の水浸出液に於ては、確かに pH 調節によつて沈澱の生起、消失が認められる。例えば、新鮮肉の稀薄アルカリ浸出液は HgCl_2 と直ちに沈澱を示すが、これを酸性にもたす時は沈澱形成を行わなくなる。然るに、一旦鮮度低下を來した魚肉の場合では pH を酸性側に維持しても、沈澱を生ずるのみならず、沈澱窒素量は酸性化前と同様で変化しない。此の事實は蛋白分子の荷電の正負だけでは説明し得ぬことである (VI.2)。更に荷電の影響であるとする、2 價の Hg^{++} イオンが所在すれば、沈澱は水銀塩の陰イオンには無関係に生ず可きであるが、 HgCl_2 と $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ とでは後者の方が沈澱量が少い (VI.3)、又、親水膠質のイオンによる凝固の場合では多價イオン程、より少量で反対イオンを中和し、凝固せしめるのが普通であるが、 Al^{+++} の如き 3 價イオンでも、 HgCl_2 よりも沈澱効果が悪いのである (VIII.2.D)。従つて、蛋白質分子の電荷の正負以外の因子をも考慮せねばならない。そのためには、蛋白分子と HgCl_2 との間の一種の配位化合物形成を想定すれば説明し得られるであらう。その証明の一つとして、沈澱物中の Hg と Cl との比を測定してみると、凡そ 1:2 の値が得られる (VII)。

Luther¹³³⁾によれば、25°C に於ける飽和 HgCl_2 は 1 立中に次の形態のものを成分として含有する。

$[\text{HgCl}_2]$	0.26 モル
$[\text{HgCl}^+]$	0.00015 モル
$[\text{H}^+]$	0.00033 モル

$[Cl^-]$ 0.00048モル

$[Hg^{++}]$ 10^{-8}

$[HgCl_4^{2-}]$ 5×10^{-6}

これから見ると Hg^{++} イオンは最も含有量が少い。著者の得た $Hg:Cl=1:2$ の関係¹³²⁾も、イオン吸着の場合には、それぞれ正負両イオンが分子構成の割合で吸着されることもあり得るから、見掛けの分子結合のように考えられぬこともないが、Luther の成績から Hg^{++} イオンが微量である事から、このイオン単独での結合は非常に機会が少いものとしてよいであろう。殊に $[HgCl_2]$ の形は 1 立中 0.26 モルで各成分中最も多く、配位化合物形成の機会も多いものとする。

従つて、魚肉水浸出液中の蛋白質と $HgCl_2$ との結合は配位化合物と認めるのが妥当であろう。

新鮮時の魚肉浸出液中の蛋白質が $HgCl_2$ と沈澱形成を行わない理由の一として、また液中に於ける安定性が考えられる。それは蛋白質分子の水和性の強さで規定出来るであろう。著者は、この安定法を測る一方法として、エチルアルコールによる脱水法を創案したが、浸出液中の蛋白を凝固せしめるに要するアルコール濃度は、新鮮肉程高濃度である事実を明かにし得た(VIII 1, 2)。即ち、新鮮魚肉では蛋白質分子を圍繞する水分子の水和層が充分強力なために、蛋白分子相互間の接觸、及び $HgCl_2$ 分子との結合の機会を阻んでいることが想像せられる。この事実は $HgCl_2$ 共存の場合のアルコールによる水溶性蛋白質の凝固を調べる事によつて、かなり明白にし得たところである(VIII, 2, BC)。勿論、蛋白質分子が、水分子を保有している基と $HgCl_2$ と結合し得る基が共通でない場合もあり得るであろうが、蛋白質の親水性が低下することは、同時に $HgCl_2$ との結合可能基の増加を伴うであろう事も理解出来るところである。

又、腐敗の場合以外でも、新鮮魚肉の稀薄アルカリ或は稀薄食塩水浸出液に於ける蛋白凝固がより低濃度のアルコールで行われる事を見出した。尿素変性の例でも、その濃度によつては明かな水和性の減少が認められる。

要するに、新鮮魚肉の水溶性蛋白質はその水和性の故に安定であり、従つて $HgCl_2$ との結合も起り難いものと考えられる。魚肉の鮮度低下による、水溶性蛋白質の水和性の減退の現象は、既往に於て明かにせられなかつた事実であり、魚肉蛋白化学に於て今後更に取上げられる可き項目と信する。

上述したような諸理由から蛋白質と $HgCl_2$ との結合は、その活性基を中心とする配位結合と考えるのが最も適當であるように推論せらるゝので、それら作用基が何であろうかの

判定を試みた (IX)。そのために活性基の封鎖を予め行い、次に HgCl_2 を加えて沈澱の有無を検した。封鎖剤として用いたものはフォルマリン並にモノ沃度醋酸である。但し両試薬は共に NH_2 基、 SH 基をも封する性質があり、この二つの基のうち、いずれが HgCl_2 と結合するかを判定出来難いが、実験結果は両試薬を以て処理した浸出液に HgCl_2 を加えても、全く沈澱反応を興えない事が明かとなつた。モノ沃度醋酸をアムモニアで中和した試薬では明瞭な沈澱を示すが、それはカルボキシルの末端の水素と置換したアムモニアと HgCl_2 との結合に依るものと思われる。その際の沈澱窒素量は HgCl_2 単用の場合と略々等しい事も注目される。赤血塩は SH 基のみを封じて NH_2 基に作用しない点、分別には好都合であるが、それ自身複塩としての蛋白沈澱を生ずるため、赤血塩処理後の HgCl_2 沈澱の検定を行うことが出来ない。

従つて現在のところフォルマリン並に沃度醋酸で封鎖せしめられるようなアミノ基をはじめ、アマイド、グアニデン、イミダゾール、インドール、スルフヒドリル等の諸基群が関与するものと想像される。一般にアルカリ側では、これら基群の活性度が増す事実が Edsall らによつて述べられているから、腐敗の進行に伴つてこれら基群の活性化も生ずるであろう。従つて単一の基でないことは勿論であろう。

French 及 Edsall (1945)⁹²⁾ に依れば、フォルマリンは蛋白質の有するであろう殆どすべての基との反応性を列挙している。アミノ基、イミノ基、アマイド基、ペプチド結合、グアニデン基、水酸基、カルボキシル基、 SH 基、芳香基等がそれである。Middlebrook (1949)¹³⁵⁾ の研究によると、最も結合性の著しいのはグルタミン酸アスパラギン酸のアマイド基、アルギニンのグアニデン基であるとしている。又、岸 (1949)¹³⁶⁾ もアミノ酸、ペプチドの硝酸銀との結合をしらべて、フォルマリンがアルカリ側でより多くの銀結合を妨害する事実を明かにしている。 NH_2 基と HgCl_2 との結合に就ての文献は少いようであるが、Salle 及 Ginoza (1943)¹³⁷⁾ は殺菌剤としての HgCl_2 が有効であるのは細菌菌体の遊離アミノ基の結合に由るものと推定している。 NH_2 基が HgCl_2 結合の有力な基であることは確かであろう。荒谷 (1949)¹³⁴⁾ はビユーレット反応に関与する部分は、ペプチド結合のアルカリによる活性化に基くと述べ、この際ペプチド結合の活性化は SH 基の出現よりは著しい事を認めた。Mehl (1945, 1949)^{127, 137)} らのビユーレット反応に関する銅原子とペプチドとの結合の研究と照応して興味深い。

SH 基と HgCl_2 との結合に就ては砒素剤などと共に調べた Fildes (1940)¹³¹⁾ の報告があり、 SH 基の添加によつて HgCl_2 の殺菌効果の減退する事実を述べている。しかし、このような微生物を対象としている場合は不明な点が多く、培地として使われる他の基質に

よつても大きな影響を受けるものと思われる。

著者の実験からは、魚肉水浸出液に 5 モルの尿素を溶存せしめた場合、SH 基の増量が認められるにも拘らず、 HgCl_2 との沈澱を生じ難い事から見て (IX, 3), 又, SH 基の反応のないゼラチン溶液の腐敗に於ても HgCl_2 沈澱の見られる事実からも (V. 6), SH 基が本沈澱反応の主體的な作用基であり得ないものとする。殊に、腐敗が進むにつれて、SH 基の反応が減少する事実 (IX, 5) から、やはり塩基性基群が主として結合に與るものとせざるを得ない。

腐敗に伴つて塩基性基の増大することは、水浸出液中の蛋白質の等電点測定結果からも明かである (IX, 6)。このようにして蛋白質の塩基性基、或は分解後の塩基性アミノ酸等が結合の主体であるとする、これらの基と HgCl_2 との間には当然化学量論的な結合が期待出来る。

定量的結合の可能性としては、同一魚肉浸出液に対して異なる量の HgCl_2 を加えて行つた場合、 HgCl_2 の量が N に対して飽和に達するまでは添加量に応じて沈澱 N 量の増加する事実、又、逆に N 量に対して充分過剰な HgCl_2 の一定量に異なる量の浸出液を加えた場合、生ずる沈澱量が浸出液量に比例する事実からも実証し得たと考える (X, 1, 2)。また、N に対して充分過剰な HgCl_2 が存在する場合は HgCl_2 の濃度を 10 倍程度変えても、N の量が一定であれば沈澱量が殆ど変わらないことも、光電比濁計の測定で明かにし得た。蛋白質の持つこのような量論的反應には、酸結合量などが挙げられる。例えば等電状態にある卵アルブミンに同一濃度の HCl , H_2SO_4 等を加える時は必ず同一の pH を與えるのは酸の結合が当量関係に行われるからであり、最近行われているコロイド滴定法¹⁴⁰⁾なども高分子化合物間に於て稀薄溶液中の結合が量論的に行われていることを根據とするものである。このような前例から見ても、蛋白質と HgCl_2 との定量的結合の存在は充分妥当であるものと思われる。

ヒューレット反応についての銅とペプチドの定量的結合も Mehl によつて光電比色とポーログラフ測定から確かめられた。

以上の諸事実から、本蛋白沈澱反応の定量的方法への拡張の根據は與え得られた、即ち魚肉水浸出液中の HgCl_2 結合性 N と沈澱量の関係を光電比濁計の測定値から図示すると、若干の分散は認められるが、比例的関係が成立つ事が明かとなつたのである (X, 3)。

然しながら、 HgCl_2 沈澱そのものを液中に微粒子として長く懸濁状態に置く事は困難であるから、光電比濁計を使用せぬ限り一般的の実施は望み難い。魚市場、水産製造工場、或は食品衛生監視員等が實際的に新鮮度判定をなす場合には短時間に実験結果を得ねばな

らないから、簡易測定法としては、定性的実験で寧ろ充分ではないかと考える。

定性的判定に於ける基準として著者は次の如き提案を行いたい。

— ……1% HgCl_2 液に魚肉の 10 倍水浸出液を滴下して全く濁濁せぬもの（多量に注加しても短時間には濁濁せず）

± ……滴下した場合、微かに濁濁を生ずるが試験管を振れば透明液となる程度

＋ ……濁濁を生じ試験管を振れば全液が微濁を呈する程度

++ ……滴下すると沈澱を生じ沈澱が管底に沈降する程度

即ち（—）乃至（++）の記号を用いて、以上の如き沈澱若くは濁濁の内容を示すものとし、A 液（1% HgCl_2 ）並に B 液（0.05% 醋酸加 1% HgCl_2 ）に於ける沈澱形成を以て、次の如き判定を行う。

A 液	±	} 初期腐敗直前
B 液	—	

A 液	+	} 初期腐敗
B 液	±	

A 液	++	} 腐 敗
B 液	+~++	

茲で特に醋酸々性とした B 液を使用する理由は、既述の（VI, 2）如く比較的鮮度低下の甚しくない魚肉水浸出液中の蛋白質は表面の活性基も少く、僅かの酸性側への pH 移動によつて沈澱阻止が可能であり、これが又初期腐敗前後の魚肉蛋白質の特性でもあるが、すでに腐敗に達した魚肉蛋白質に於ては、このような阻止が不可能であつて、醋酸の存否に関せず沈澱を形成するからである。

このようにして、イワシ、サバ、カツラ、マグロ、カジキ、ブリ、カレイ、タラ等の硬骨魚類、クヂラ、畜肉等には、著者の実験によつて本沈澱反応の応用が可能であることが見出されたが、なお例外として本方法の適用出来ないものにサメ及イカがある。但しサメの新鮮肉では HgCl_2 沈澱を生じないので、新鮮肉としての判定は可能であるが、サメ肉の腐敗は極めて特殊であつて、著者の実験では、その蛋白質が分解している程度はアムモニアの増量或は HgCl_2 沈澱反応では正確に把握出来ない。それは専らサメ肉の特異成分である尿素の分解が先行して、蛋白質そのものは比較的細菌に消費せられないからである。その一つの理由はサメ肉蛋白質の水に対する不溶性と云うことで特色づける事が出来る。この特性は新たに著者によつて指摘された所であるが、煉製品製造原料としてのサメ肉の利用性が他の魚種と区別される所以も此の知見に基いてよく理解する事が出来る。サメ肉

蛋白質の不溶性は、サメの腐敗に応じて水浸出液中の HgCl_2 沈澱中の N/Hg の値を測定する事によつて明かにし得た (XII, 1)。即ち N/Hg が他の魚種に比較して極めて低い値を示すのは、水中に溶出する高分子の蛋白質が少いために外ならない。従つて反応に關與するのは低級窒素化合物が大部分であつて、蛋白沈澱反応としては本質的に不適当な魚種と云わねばならない。

イカ肉の場合はその特異な HgCl_2 との親和性の故に新鮮肉と雖も明瞭な沈澱をつくる。従つて全く本反応による新鮮度判定は意味をなさない。特に興味のあるのはフォルマリンで封鎖し得ない基がイカ肉には所在しそれが顯著に HgCl_2 と反応を呈するのである。その N は全 HgCl_2 沈澱 N 中 50~60% を占める。これらも在來全く注意せられなかつた新事実であり、このような研究法を通じて、各種水産物肉の蛋白質を分別する一方向が示されるように考えられる。

しかし、イカ肉の場合ではアルコールによる凝固反応をしらべると、比較的他の魚肉に近い数値が得られるので、アルコールによる沈澱反応を採用し得る余地がある。

次に、新鮮度判定を行う場合の魚肉試料の採取位置であるが、魚体の部位によつて変敗の程度が異なることが多いから、その点注意が必要であり、出来るだけ各部分別にしらべる事が望ましい。本沈澱反応の如きは少量宛の試料を各位置に就て採り、各々を検する事が出来るから便利が多いと思う。表面肉と深部肉との変敗の差異を明かにし得れば、或程度までその魚肉の経歴、即ち保持温度時間を判定し得る事も明かにし得た (XIII)。

更に加熱肉の場合であるが、この浸出液に於ても鮮肉と同様な反応が起り得、その沈澱の主体をなすものは蛋白質と見做して差支えないことが確認せられた。この事は加熱肉に就て、鮮肉時に溯つての判定が可能である事を示すものであつて、罐詰原料等の鮮度管理に極めて有効な方法*と云ふことが出来る。即ち鮮肉の場合新鮮であるものは加熱肉に於ても沈澱反応を興えることなく、その間に充分密接な關係のあることがわかる。

又、魚肉の水浸出液を加熱した場合に蛋白質がとる凝固像を比較することによつても、新鮮度の判定は可能である。凝固像に就て興味ある事実は新鮮肉の場合に均質な凝固が得られるに反し、鮮度低下の場合に於ては網目狀の凝固をつくることである。この相違は抽出せられる蛋白質の形状が異なることに起因すると推定せられる。何故ならば、 NaCl 抽出液では新鮮肉に於ても網目狀の構造をとる事実から見て、鮮度低下魚肉の水溶性蛋白もその形状が鎖狀(棒狀)であろうことが推定せられるからである。 NaCl で抽出せられる蛋白質ミオシンは流動複屈折による觀察から棒狀分子である可きことが知られて居り、このも

* 静岡地区の鮭油漬罐詰工場では 1949 年以後、本法を應用して原魚の鮮度判定に役立てている。

のが上述した網目状凝固をとることが類推されるのである。このような一見簡単な実験事実も既往に行われたことがなく、單に新鮮度判定ばかりでなく、鮪謹詰のハニカム（蜂窩状変敗）の成因等に対しても示唆を與えるものと考ええる。

XVII 結 論

1. W. Walkiewicz が獸肉に就て見出した昇汞沈澱反応による初期腐敗檢出法を檢討し、これが魚肉に対しても、その新鮮度判定に利用し得ることを知つた。

2. 魚肉水浸出液と HgCl_2 との沈澱は腐敗の初期に於ては魚肉水溶性蛋白質が主であつて、アムモニア、塩基性アミノ酸等は少いものと考え得られる。然し腐敗の後期にあつては、蛋白質以外の低級窒素化合物の参加も認められる。即ち腐敗経過に於ける窒素化合物の変化と密接な關係を有する。

3. 魚肉の水浸出を行う際の浸出時間は 30 分で足り、一定の魚肉に就て浸出する窒素量は浸出用水量に関係なく一定である。浸出時間は定性的判定の際は 5~10 分で充分であらう。

4. 同一魚肉の水浸出を行う際、その新鮮度に応じて溶出窒素量が変化する理由は、主に蛋白質窒素の溶出如何にかゝり、蛋白質溶出量を支配する因子は腐敗の進行と共に変化する魚肉自身の pH 並に肉中より遊離する無機塩類の如きも關與するものと推定する。

5. HgCl_2 は新鮮魚肉と雖も、その稀薄アルカリ抽出蛋白質、稀薄中性塩抽出蛋白質と顯著に沈澱反応を與える。即ちグロブリン系の蛋白質には魚肉の鮮不鮮に拘らず沈澱を示す。その理由はこれらの蛋白質には純水可溶性蛋白質に比較して、表面に於ける活性基がより多いためと考えられる。従つて本方法を実施する際には浸出用水にアルカリ、中性塩等の混入を避ける必要がある。

6. この沈澱現象に於ては Hg^{++} イオンと反対イオンとしての蛋白分子との塩形成よりも、沈澱中に HgCl_2 として参加するような配位化合物的結合が行われるものと考ええる。

7. 新鮮魚肉水浸出液中の蛋白質が HgCl_2 と反応しない理由は、蛋白質自身の持つ荷電の影響よりも寧ろその水和力の強さが安定性を與え、沈澱を阻止しているものと解釈される。

8. 又、鮮度低下魚肉の水溶性蛋白質は水和力の減少と共に HgCl_2 と結合し易き多くの活性基を分子表面に露出して來るものと考えられる。

9. それらの活性基は恐らくペプチド結合開裂の際生ずるアミノ基をはじめ多くの塩基

性基であろう。SH 基との結合も考え得られなくはないが、少くとも沈澱反応の主体をなす活性基ではない。

10. 魚肉水溶性蛋白質と HgCl_2 との結合は定量的に行われる。従つて光電比濁計等による定量的方法への拡張も可能である。但し、簡易判定法としては定性的方法で充分であろう。

11. 魚肉水浸出液中の水溶性蛋白質のアルコールによる凝固現象は、その新鮮度と密接な関係があるので、この方法によつても鮮度判定は可能である。

12. 魚肉水浸出液の加熱によつて生ずる蛋白質の凝固像も又その新鮮度と密接な関係があるので、これも鮮度判定の一方法となり得る。

13. HgCl_2 沈澱に於てその沈澱物中の N/Hg の比を測定することは、蛋白質その他と HgCl_2 との結合が定量的に行われ得る限り、蛋白質分子の大きさ、種類等を分別してゆく上に有効な一方法であらうと考える。

14. 魚肉の鮮度低下は魚体各部均一に進行するものではないから、本沈澱反応の如き簡易法で、各部の腐敗の差異を明かにすることが必要であると思う。

15. サメ肉はその腐敗経過に於て尿素の消費が専ら行われ、蛋白質の変敗は少いと云う特異な魚種に属するためと、沈澱物の内容が当初から低紙窒素化合物が多いことの理由によつて、本沈澱反応を以て判定を行うことは適當でない。

16. イカ肉は新鮮時に於て既に HgCl_2 と結合する基を有するために、本法の適用は全く不能であるが、アルコールによる凝固沈澱反応はイカ肉の鮮度判定に役立つであらう。

17. 本沈澱反応は加熱肉の品質判定にも応用可能である。新鮮時に本反応陰性のものは加熱後の肉に就ても陰性であり、加熱肉に於ても、その浸出液中の HgCl_2 沈澱は蛋白質が主体と見做し得る。

18. 以上の諸事実から HgCl_2 による魚肉水浸出液の沈澱反応を以てする新鮮度判定法が簡易に広く実施し得るものと認め、茲にこれを提案する。

CHEMICAL STUDIES ON THE FRESHNESS TEST OF AQUATIC FOOD PRODUCTS*

Keishi AMANO

(Tokai Regional Fisheries Research Laboratory)

SUMMARY

As a simple and rapid method to measure the degree of freshness of fish meat precipitation test of aqueous extract of fish meat by mercuric chloride (HgCl_2) was studied.

The present author proved in this paper that this method, originally introduced by W. Walkiewicz for the freshness test of raw beef, is quite reliable and fitted for the purpose of detecting the decomposition of fish meat in its early stage, for the extract begins to precipitate by HgCl_2 as early as the volatile nitrogen amounts to 30 mg/100 g of the meat at its pH value of 6.0-6.2.

In the first stage of decomposition of fish meat HgCl_2 reacts chiefly with protein in the aqueous extract of the meat, and naturally, protein is the prominent constituent of the precipitate produced accompanied by less amount of ammonia and some basic amino acids, the total quantity of the precipitate is little in this stage. As the deterioration of the fish meat advances lower nitrogen compounds other than protein which are produced by the decomposition of meat tend partly to play a role in the HgCl_2 reaction.

Thus HgCl_2 reaction, having a close correlation with the amount of lower nitrogen compounds, serves to indicate the degree of deterioration of muscle protein.

Preparation of the fish meat extract for freshness test is quite simple and it can be finished within 30 min. It was proved that practically a single treatment is sufficient for the thorough extraction.

Extractive nitrogen is affected neither by the quantity of water used nor the conditions of extraction such as application of mechanical agitation.

It may presumably be assumed that the amount of soluble nitrogen depends on the grade of deterioration, it happens sometimes to decrease in case of slight decomposition. This phenomenon may be attributed to the effect of change of hydrogen ion concentration as well as the amount of free inorganic salts during the course of spoilage of meat. Thus even with meat of high degree of freshness precipitation by HgCl_2 appears remarkably both in weak alkaline extract and neutral salt extract. Caution, therefore, should be paid for the preparation of test solution to eliminate these sources of error.

* Received for publication, August 15, 1950.

It is desirable to use distilled water or pure tap water, if possible for the extraction.

It seems probable that globulin type protein which can easily be extracted by alkaline or neutral salts readily combines with the mercuric salts, for the protein in this form bears groups on the surface of its molecules which are far more active than those of the pure water soluble proteins.

Analysis of the precipitates shows that the ratio of the amount of mercury to that of chlorine well agrees with that in HgCl_2 , viz 1:2, hence the author assumes the possibility of formation of molecular compound between the soluble protein and HgCl_2 .

So that it is doubtful to expect the salt formation of anionic protein with cationic mercury when taking notice of the fact that HgCl_2 gives a marked coagulation with the extract of stale fish meat whose pH value having been adjusted to 4.5 previously, this precipitation phenomenon can hardly be explained as the effect of discharge reaction between positive metallic ions and negative protein molecules. It may be quite natural to assume that in case of decomposition of fish meat, soluble protein which has many active radicals at its termini easily combines with metallic salt and produces precipitate as molecular compound protein- HgCl_2 .

Non precipitability of fresh meat extract by HgCl_2 may be attributed to the stability of soluble protein, the stability is more affected by the strength of hydration around the protein molecules than by their electric charges. Concerning the above the author examined the effect of alcohol on the stability of soluble protein in relation to the freshness of fish meat, the result disclosed that the concentration of alcohol necessary to coagulate protein in the extract of fresh meat (10 g of meat: 100 cc of water) lay between 70 and 80% while in case of decayed meat it fell to 30–40%, this difference in the concentration necessary for coagulation must be due to the discrepancy in the strength of the hydration of protein as it is fresh and decomposed.

The decrease in the strength of hydration seems to be caused by the appearance of non-polar groups which exist within inner portion of the molecule before degradation of protein and at the same time many active groups, which attract mercuric chloride, develop on the surface of protein molecule.

To these active groups belong free amino groups, derived from peptide linkage, amide group, guanidine and other basic radicals, sulfhydryl group may also be mentioned as one of the reactive radicals, but the author takes the view that this group plays rather a poor role in HgCl_2 reaction when he notices the fact that the protein in the extract of fish meat which is denatured by urea to present SH group does not react with HgCl_2 .

As there exist really a definite ratio of combination between soluble nitrogen and HgCl_2 , the writer examined nephelometric determination of HgCl_2 coagulable

nitrogen by electric photometer and obtained satisfactory result. It was shown that increase of the turbidity is fairly proportional to the amount of HgCl_2 reactive nitrogen. On the basis of these experiments it will be able to secure quantitative determination of HgCl_2 precipitable nitrogen in extract of fish meat, however, for practical purpose, the author recommends the method observing the extent of precipitate in test tube, as it is simple and equally reliable as the nephelometric method.

Besides the HgCl_2 reaction, it should be also noticed that coagulation of protein in alcohol solution is one of the characteristic reaction closely related to freshness of fish meat, therefore it will be serviceable as a test for fresh fish inspection.

Results obtained by heat coagulation test on the aqueous extract of fish meat is worth noticing. Extract from fresh meat causes no coagulation by heating but a slight turbidity, while that from fish meat in its first stage of decomposition produces a marked homogeneous coagulum, and as the spoilage advances the coagulum turns to take a network appearance, these changes of coagulum figure according to the degree of deterioration of fish meat may serve as an aid to sensory judgment of the quality of canned fish meat prior to the canning operation.

The author discovered that the ratio of the amount of nitrogen and mercury in the precipitate represents the degree of freshness of the original fish meat in the first stage of decomposition the major part of the precipitate by HgCl_2 is composed of protein molecules hence the ratio N/Hg presents a higher value than that obtained in case of post spoilage meat.

As in an unfolded state of protein molecules the number of HgCl_2 reactive radicals is comparatively few and the remaining unlinked groups are well assorted in the molecules as compared with those of stale fish meat protein thus we estimate approximately the magnitude of protein molecules by taking the ratio N/Hg in the precipitate, when the fish meat lies under the condition of beginning decomposition.

The author suggests here that the HgCl_2 reaction is also applicable to the freshness test of boiled fish meat to meet the canner's requirement, as it was proved by the author that the major constituent of the precipitate of the extract from heated fish meat by HgCl_2 is also proteins.

HgCl_2 reaction can not be applied to shark fish and cuttle fish or squid. Shark meat, even in the first stage of spoilage, contains a remarkable quantity of ammonia in its muscle derived from urea, which turns the pH value of the meat to alkaline side, hence a strong positive HgCl_2 reaction is seen in spite of little deterioration of protein fraction. As to the aqueous extract of cuttle fish, it contains some unknown substance which combines with HgCl_2 , whereas even at its highly fresh state, the aqueous extract of the cuttle fish meat causes

remarkable precipitation with HgCl_2 . This unknown substance cannot be fixative by formaldehyde nor by monoiodoacetic acid treatment prior to the adding of HgCl_2 . Study of this unknown substance is now in progress.

The author recommends the following procedure for the practical application of the method.

(a) Preparation of test solution

Take 5 or 10 g of chopped fish meat in a beaker, add a quantity of water 10 times of the meat in volume, stir the water with a glass rod for a few minutes (for quantitative test 30 min. are necessary) and then filter the extract through paper.

(b) Reagent

Solution A 1% HgCl_2 solution.

Solution B 1% HgCl_2 solution containing 0.05% acetic acid.

(c) Procedure

Add the filtrate (test solution) gently drop by drop to 5 cc of the solution A and B separately.

(d) Judgment

Let the signs denote as follows.

—.....No turbidity by adding the extract in excess.

±.....Slight turbidity which disappears on shaking the tube.

+.....Precipitation; turbidity extends over the whole solution on shaking the tube.

++.....Heavy precipitation; precipitate descends to the bottom of the tube.

Then the degree of freshness or deterioration can be judged as follows:

Solution A	—	}	Fresh
Solution B	—		
Solution A	±	}	On the point of starting spoilage
Solution B	±		
Solution A	+	}	Early stage of decomposition
Solution B	+		
Solution A	++	}	Advanced stage of spoilage
Solution B	++~		

文 献

* は直接原報を閱讀出来なかつたものを示す。

- 1) 田内森三郎・広瀬郁郎・和田英夫：水産講習所試験報告，26, 79, 1931
- 2) 田村健治：日本水産学会誌，1, 4, 1932
- 3) 山田紀作・北野栄一：同誌，13, 6, 232—236, 1948
- 4)* 上田大助・伊藤秀三郎：電気評論，23, 4, 365—370, 1935
- 5) 伊藤秀三郎・京塚亘夫・杉崎千登子：日本農芸化学会誌，23, 5, 192—193, 1949
- 6) P. A. Vassiliow: Z. Fleisch-Milchhyg., 40, 363—367, 1930
- 7) I. A. Smorodintzew & N. N. Krylova: J. Biochem., 23, 453—454, 1936
- 8) W. Eber: E. Abderhalden; Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. IV Teil 8. 1. 695, 1923
- 9) J. Tillmans & R. Otto: Z. Untersuch. Nahr.-Genussm., 47, 25, 1924
- 10) 清水正雄：日本農芸化学会誌，9, 730, 1925
- 11) 木村金太郎・熊倉哲：Proceedings of the Pan-Pacific Science Congress, 5, 2709, 1934
- 12) 谷川英一：水産製造会誌，3, 5, 267—296, 1935
- 13) 谷川英一：同誌，3, 6, 319—346, 1935
- 14) S. A. Beatty & N. E. Gibbons: J. Biol. Bd. Canada, 3, 77, 1937
- 15) 大谷武夫・角英悦：水産講習所試験報告，22, 1921
- 16) 山田紀作・新聞彌一郎：日本水産学会誌，14, 23—26, 1948
- 17) H. I. A. Tarr: J. Fish. Res. Bd. Canada, 4, 367—377, 1940
- 18) C. E. M. Pugh & J. H. Quastel: Biochem. J., 31, 282, 1937
- 19) M. E. Stansby & L. M. Lemon: Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 15, 208, 1933
- 20) J. T. R. Nickerson & B. E. Proctor: J. Bact., 30, 383, 1935
- 21) 小幡彌太郎・座間宏一：日本水産学会誌，15, 499—501, 1950
- 22) 小幡彌太郎・山西貞，石川昌男：同誌，15, 551—553, 1950
- 23) 小幡彌太郎・山西貞：同誌，15, 554—556, 1950
- 24) F. Budajan: Z. Untersuch. Lebensm., 64, 226, 1932
- 25) L. H. Almy: J. Amer. Chem. Soc., 47, 1831, 1925
- 26) 谷川英一：水産製造会誌，3, 135, 1935

- 27) R. W. Clough: *Pub. Puget Sound Biol. St.*, 3, 195, 1922
- 28) H. C. Bradley & B. E. Bailey: *Food Res.*, 5, 487, 1940
- 29) A. E. Mirsky & M. L. Anson: *J. Gen. Physiol.*, 18, 307, 1935
- 30) A. Todrick & E. Walker: *Biochem. J.*, 31, 292, 1937
- 31) 森高次郎・秦満夫：日本水産学会誌，15，407—411, 1949
- 32) 森高次郎・秦満夫：日本水産学会年会講演 1949年 4月
- 33) 森茂樹：農化，18，41—46, 1942
- 34)* R. Kuhn & P. Desnuelle: *Z. Physiol. Chem.*, 251, 14, 1938
- 35)* O. V. Fürth: *Z. Untersuch. Nahr.-Genussm.*, 24, 89, 1912
- 36) 山田紀作・新聞彌一郎・鈴木たね子：日本水産学会誌，13，41—43, 1948
- 37) 山田紀作：同誌，13，44—47, 1948
- 38) 秋谷七郎・本橋信夫：第4回鯨類研究所研究発表会講演，1949年5月
- 39) 天野慶之・外5名：南氷洋産冷凍鯨肉に関する研究報告，19—43, 1949
- 40) 天野慶之・竹井誠：日本水産学会講演，1946年10月，1947年4月及び10月
- 41) 食品衛生検査指針，183, 1950（厚生省刊）
- 42) J. Tillmans, R. Strohecker & W. Schütze: *Z. Untersuch. Nahr.-Genussm.*, 42, 69, 1921
- 43)* A. J. J. v. Velde: *Natur. Wet. Tijdschr*, 19, 41—48, 1937
- 44) J. Tillmans & H. Mildner: *Z. Untersuch. Nahr.-Genussm.*, 32, 65, 1916
- 45)* J. Tillmans & Splittgerber: *Z. Untersuch. Nahr.-Genussm.*, 23, 49, 1912
- 46) L. Faber: *Food*, 18, 24—25, 1949
- 47) R. Herzner & O. Mann: *Z. Untersuch. Lebensm.*, 52, 251, 1926
- 48)* P. Andrijewski: *Z. Infekt.-Krankh. Haust.*, 32, 89, 1927
- 49) C. F. Van Oyen: *Z. Fleisch-Milchhyg.*, 43 429 & 449, 1933
- 50) C. Postma: 同誌，182 & 206, 1934
- 51) 大島幸吉：札幌農林学会報，第19年，85号，1927
- 52) F. Hillig & E. P. Clark: *J. Assoc. Off. Agr. Chem.*, 21, 688—95, 1938
- 53) F. Hillig: *J. Assoc. Off. Agr. Chem.*, 22, 116—18, 1939
- 54) J. A. Clague: *Food Res.*, 7, 56—67, 1942
- 55) G. J. Sigurdsson: *Anal. Chem.*, 19, 892—902, 1947
- 56) 天野慶之：家畜衛生，2, 5（印刷中）1950

- 57) W. Walkiewicz: Z. Fleisch. Milchhyg., 46, 171—174, 1936
- 58) G. Busch: 同誌, 46, 421, 1936
- 59) H. Keller & H. Möller: 同誌, 49, 141—143, 1939
- 60) 坂口謹一郎・田村学造: 水産研究会報告第2号, 1949
- 61) A. C. Hunter: J. Bact., 5, 543—552, 1920
- 62) 猿谷九万: 水産講習所研究報告, 27, 25, 1932
- 63) 木俣正夫: 日本水産学会誌, 4, 215—216, 1935
- 64) 今井米喜: 国民衛生, 12, 2, 181, 1925
- 65) 木村金太郎: 水産製造全書, 上巻 10—11, 1933
- 66) 市川收・斎藤保二外: 衛生獣医学集談会講演, 1949年11月
- 67) F. Weber & J. Wilson: J. Ind. Eng. Chem., 11, 121, 1919
- 68) L. Rosenthaler: Der Nachweis organischen Verbindungen 1923
- 69) H. Meyer: Nachweis und Bestimmung organischen Verbindungen, 1933
- 70) R. W. Webster: Legal Medicine & Toxicology, 462, 1937
- 71) 藤井暢三: 生化学実験法定量篇, 63頁 (9版) 1949
- 72) 藤井暢三: 生化学実験法定性篇 82 頁, (9版) 1949
- 73) Bergmann: J. Biol. Chem., 110, 471, 1935
- 74)* Bungenberg de Jong & Saubert: Biochem. Z., 288, 1, 1936
- 75) S. E. Michael: Biochem. J., 33, 924, 1939
- 76) H. Wasteneys & H. Borsook: J. Biol. Chem., 62, 1—14, 15, 633, 675, 1924
- 77) 谷川英一: 水産製造会誌, 3, 113, 1935
- 78) 神立誠外: 日本農芸化学会講演, 1949年6月
- 79) 清水亘: 日本水産学会誌, 12, 73, 1943
- 80) 清水亘: 同誌, 12, 103, 1943
- 81) 清水亘: 同誌, 12, 131, 1943
- 82) 清水亘: 同誌, 12, 165, 1944
- 83) J. G. Sharp: Food. Invest. Bd. for the Year 1932. 201, 1933
- 84)* A. Janke & L. Jirak: Biochem. Z. 271, 709, 1934
- 85) W. Rudolph: Z. Untersuch. Lebensm., 75, 428, 1938
- 86) F. W. Foreman & G. S. G. Smith: Food Invest. Special. Rept. No. 31

1928

- 87) H. R. Kruyt: Colloids, 1927 (玉虫文一, 膠質化学, 207—208, 1939)
- 88) 鮫島実三郎: 膠質学, 456—463, 1947 (6版)
- 89) 佐々木恒孝: 化学の領域, 2, 378—382, 432—437, 3, 71—76, 1949
- 90) F. Bischoff: J. Biol. Chem., 158, 29, 1945
- 91) H. Neurath, J. P. Greenstein, F. W. Putnam & J. O. Erickson: Chem. Rev., 34, 158—253, 1944
- 92) D. French & J. T. Edsall: Advances in Protein Chemistry, 2, 277—335, 1945
- 93) C. Huggins & E. V. Jensen: J. Biol. Chem., 179, 645—654, 1949
- 94) C. L. A. Schmidt: Chemistry of Amino Acids & Proteins, 1945
- 95) 吉村壽人: pHの理論と測定法, 95, 1940
- 96) 松井元太郎・野田稻吉・神原周・小山田茂: 工業化学雑誌, 35, 1427—1434, 1434—1437, 1932
- 97)* W. T. Astbury & R. Lomax: J. Chem. Soc., 846, 1935
- 98) W. T. Astbury & S. Dickinson, K. Bailey: Biochem. J., 29, 2351, 1935
- 99)* K. J. Palmer: J. Phys. Chem., 48, 12, 1944
- 100) 殿村雄治: 科学, 20, 42, 1950及酵素化学シムポジウム講演, 1949年10月
- 101) Szent-Gyorgyi: Science, 110, 411—413, 1949
- 102) H. H. Weber, J. T. Edsall & A. von Muralt: The Chemistry of Muscular Contraction, 1947
- 103) E. C. Bate-Smith Advances in Food Research, 1, 1, 1948
- 104) 野口栄三郎: 日本水産学会誌 1, 121—123, 1932
- 105) 森高次郎・小林敏雄: 日本水産学会講演1949年4月
- 106) 高橋豊雄・田中武夫: 同上, 1949年11月
- 107) H. A. Krebs: Ergebnisse der Enzymforschung, 3, 1934
- 108) 信濃栄: 化学研究所講演集(京都) 11, 159, 1941
- 109) 満田久輝: 同上, 11, 167, 1941
- 110) 清水耳: 蒲鉾, 88—89, 1944
- 111) S. A. Beatty & N. E. Gibbons: Progress Rept. Biol. Bd. Canada. 15,

1934

- 112) 天野慶之：魚肉鮮度検査法，11—15，1949
- 113) 天野慶之等5名：南氷洋産冷凍鯨肉の冷蔵保管中の変化に就て（謄写）冷凍魚介類
價格査定委員会刊行，1949年9月
- 114) A. J. Wood, G. J. Sigurdsson & W. J. Dyer: J. Fish. Res. Bd. Canada, 6, 53, 1942 及 Food Res., 9, 183, 1944
- 115) R. P. Elliot: Food Res., 12, 87, 1947
- 116) 水島三一郎・島内武彦：蛋白質の構造，80，1949
- 117) 赤堀四郎・谷久也：蛋白質，65—66，1948
- 118) 平野弘：水産試験調査資料，6，63—66，1948
- 119) 江良至徳：静岡縣水産試験場事業報告（第30回）119—126，1934
- 120) 江良至徳：鮪漁業と鮪類罐詰業，59—67，1937
- 121) O. F. Denstedt & B. E. Bailey: Pacific Fisherman 32, 15, 1934
- 122) 松生義勝：水産研究誌，30，277—283，1935
- 123) 天野慶之・内山均：日本水産学会誌，14，165—172，1948
- 124) 天野慶之・内山均・富谷章子：日本水産学会誌，15，262—266，1949
- 125) J. M. Shwan: Proc. Soc. Agr. Bact., 15, 56, 1944
- 126) J. W. Mehl: J. Biol. Chem., 157, 173, 1945
- 127) J. W. Mehl, E. Pacovska & R. J. Wingler: J. Biol. Chem., 177, 1949
- 128) 平野弘：日本化学会誌，63，345—348，1942
- 129) 平野弘：日本化学会誌，63，644—649，1942
- 130) 平野弘：日本化学会誌，63，1081—1084，1942
- 131) 平野弘：日本水産学会誌，8，29，1939
- 132) 玉虫文一：膠質化学，150，1939
- 133) R. Luther: J. W. Mellor; A Comprehensive Treatise on Inorganic and
Theoretical Chemistry, vol. 4, 882, 1940
- 134) Herriot: Advances in Protein Chemistry, 3, 167, 1947
- 135) W. R. Middlebrook: Biochem. J. 44, 17—23, 1949
- 136) 岸三二：生化学，21，41，1949（講演要旨）
- 137)* A. J. Sallé & Y. W. Ginoza: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 54, 85—87,
1943
- 138) 荒谷眞平：生化学，21，1—12，1949
- 139)* P. Fildes: Brit. J. Exp. Path., 21，67—73，1940
- 140) 寺山宏：化学の領域，2，79—81，1948

昭和 25 年 12 月 20 日 印刷

〔非賣品〕

昭和 25 年 12 月 25 日 發行

編 集 並
發 行 者

東 海 區 水 産 研 究 所

東京 都 中 央 區 月 島 三 号 地

印 刷 所

株 式 会 社 柏 榮 社 印 刷 所

東京 都 江 東 区 深 川 福 住 町 一 丁 目 四 番 地

